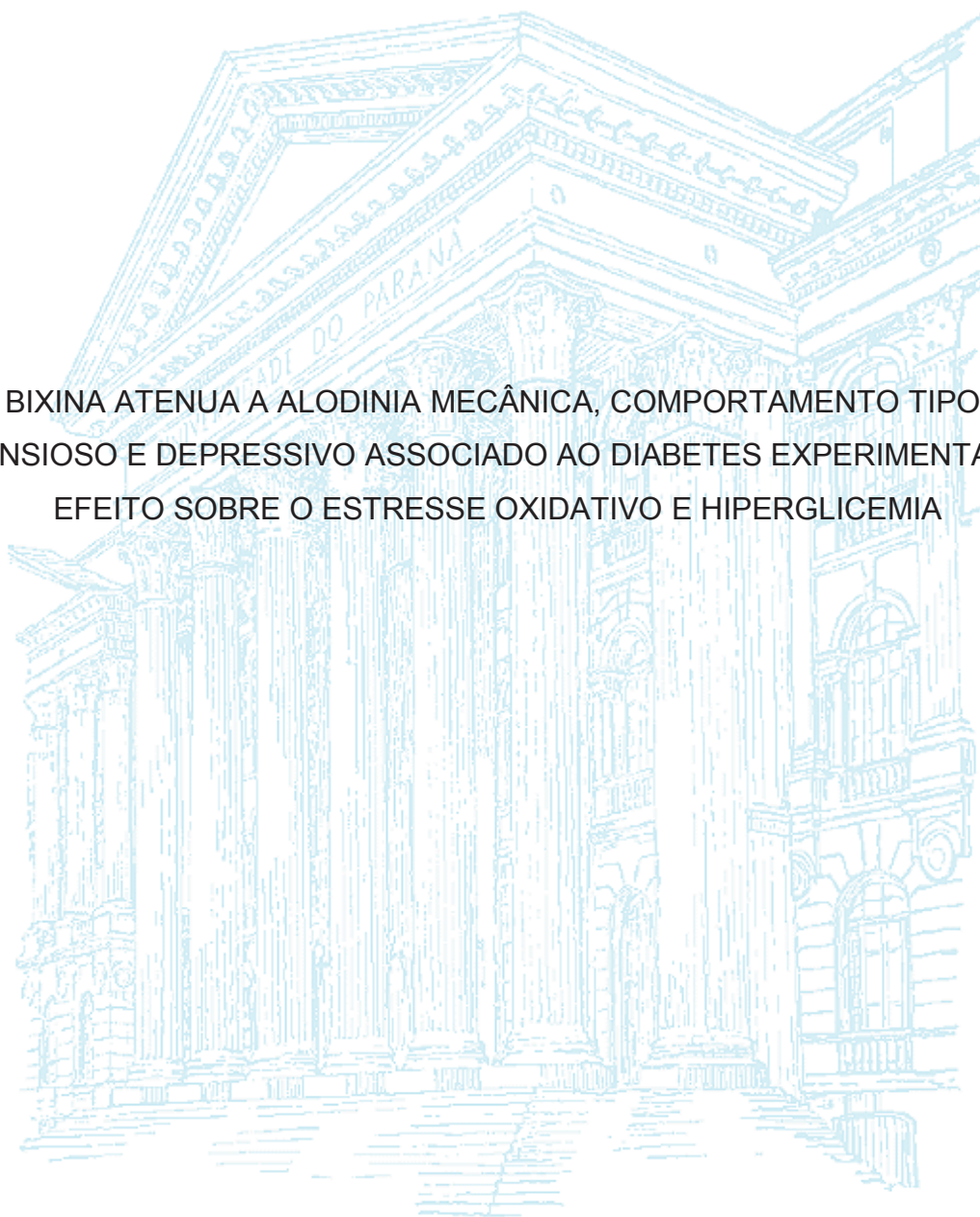


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALÉXIA THAMARA GASPARIN

BIXINA ATENUA A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO-
ANSIOSO E DEPRESSIVO ASSOCIADO AO DIABETES EXPERIMENTAL:
EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERGLICEMIA



CURITIBA

2020

ALÉXIA THAMARA GASPARIN

BIXINA ATENUA A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO-
ANSIOSO E DEPRESSIVO ASSOCIADO AO DIABETES EXPERIMENTAL:
EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERGLICEMIA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Gasparin, Alexia Thamara

Bixina atenua a alodinia mecânica, comportamento tipo-ansioso e depressivo associado ao diabetes experimental : efeito sobre o estresse oxidativo e hiperglicemia. / Alexia Thamara Gasparin. – Curitiba, 2020. 89 p.: il.

Orientadora: Joice Maria da Cunha.

Coorientadora: Janaína Menezes Zanoveli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Diabetes. 2. Bixa orellana. 3. Insulina. 4. Plantas medicinais. 5. Glicemia. 6. Comorbidade. I. Título. II. Cunha, Joice Maria da, 1973-. III. Zanoveli, Janaina Menezes. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALÉXIA THAMARA GASPARI** intitulada: **BIXINA ATENUA A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E DEPRESSIVO ASSOCIADO AO DIABETES EXPERIMENTAL: EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A HIPERGLICEMIA**, sob orientação da Profa. Dra. JOICE MARIA DA CUNHA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

05/01/2021 17:33:19.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/01/2021 17:28:35.0

VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE)

Assinatura Eletrônica

06/01/2021 08:58:58.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 67406

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 67406

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço imensamente a Deus, por minha família, pelas graças, e oportunidades de vida concedidas. Amplio esse agradecimento à Nossa senhora Aparecida que sempre intercedeu por mim, auxiliando com que os momentos difíceis se tornassem mais leves.

A minha família, que me permitiu ter a oportunidade de estudar e alcançar sonhos. Além disso, me deu suporte e acompanhou meus melhores e piores dias, sempre presentes.

Ao meu amor, Lenard, por todo o incentivo e compreensão. Até nos dias mais cinzentos, sempre encontrei acalento no seu abraço casa. Sua alegria me ensinou a perseverar e nunca desistir.

A todos os meus companheiros de laboratório, por todo o apoio, conversas e vivências.

Aos meus irmãos de mães diferentes, Carlos, Bruna e Evelize, que muito mais do que colegas de equipe, se tornaram minha família. Não conseguiria expressar tamanha gratidão pela amizade, companheirismo e pelo trabalho em equipe. Guardarei vocês em meu coração, com muito carinho, para sempre.

A minha orientadora, Joice, por ter acreditado no meu potencial, por todos os ensinamentos e risadas. Parabéns por enxergar seus orientandos como humanos, cada um com suas diferenças e limitações, mas sempre incentivando o melhor de nós, de acordo com nossas afinidades. Estendo meu profundo agradecimento à minha co-orientadora, Janaína, e a parabenizo igualmente.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração tão necessários, que me ajudaram a recarregar as baterias com muitas risadas e brincadeiras.

A todos os animais experimentais utilizados os quais, mesmo que de forma inconsciente, doaram suas vidas em prol da ciência.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A UFPR pelos materiais e estrutura física.

A todos aos amigos e colaboradores que, embora não citados nominalmente, foram importantes para realização desse trabalho.

“Te mostro um trecho, uma passagem de um livro antigo
Pra te provar e mostrar que a vida é linda
Dura, sofrida, carente em qualquer continente
Mas boa de se viver em qualquer lugar
Volte a brilhar, volte a brilhar
Um vinho, um pão e uma reza
Uma lua e um sol, sua vida, portas abertas”

Anjos (Pra quem tem fé) – O Rappa

RESUMO

A dor neuropática, depressão e ansiedade são comorbidades comuns em pacientes diabéticos, frequentemente ocorrendo de maneira concomitante. A fisiopatologia dessas doenças é considerada multifatorial, entretanto, a hiperglicemia e o estresse oxidativo (EO) parecem exercer um papel crucial para seu início e desenvolvimento. Tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis apresentam baixa eficácia e efeitos colaterais associados, resultando em baixa adesão pelos pacientes. Esses fatos evidenciam a necessidade de terapias alternativas para esses pacientes. A bixina (BIX) é um diapocarotenoide lipossolúvel, extraído das sementes de *Bixa orellana*, uma árvore nativa do Brasil conhecida popularmente como urucum. Diferentes estudos têm mostrado resultados promissores desse carotenoide em modelos não-clínicos, especialmente a partir de seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hipoglicemiante. Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do tratamento com a BIX sobre a alodinia mecânica, comportamento tipo-ansioso e depressivo associado ao diabetes experimental, assim como os mecanismos envolvidos. Para isso, ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina, foram tratados durante 17 dias (iniciando 14 dias após a indução do diabetes) com veículo, BIX (10, 30, ou 90 mg/kg), ou insulina (INS; 6 UI; controle positivo). A alodinia mecânica, e o comportamento do tipo-ansioso e depressivo foram avaliados pelos testes do Von Frey eletrônico, labirinto em cruz elevado e natação forçada, respectivamente. A atividade locomotora foi mensurada pelo teste do campo aberto. Hemoglobina glicada (HbA1) e parâmetros indiretos do EO (peroxidação lipídica-LPO, glutathiona reduzida-GSH, catalase -CAT e superóxido dismutase-SOD) foram avaliados no hipocampo, córtex pré-frontal, medula espinal lombar e nervo ciático. Animais diabéticos desenvolveram alodinia mecânica, comportamentos do tipo ansioso e depressivo, aumento do percentual de HbA1 e dos parâmetros indiretos do EO, nos tecidos avaliados. O tratamento agudo e repetido com BIX (em todas as doses) foi efetivo em atenuar significativamente a alodinia mecânica nos ratos diabéticos, enquanto o tratamento repetido atenuou os comportamentos do tipo ansioso (todas as doses) e depressivo (30 e 90 mg/kg), sem alterar a atividade locomotora. Os tratamentos com BIX (todas as doses) ou INS restauraram os parâmetros oxidativos nos tecidos analisados e reduziram o percentual plasmático de HbA1. Os dados obtidos permitem-nos concluir que a BIX, atenuando o EO e a hiperglicemia, pode representar uma alternativa para o tratamento das comorbidades associadas ao diabetes.

Palavras-chave: *Bixa orellana*. Insulina. Estreptozotocina. Comorbidades diabéticas. Carotenoides. Plantas medicinais. Glicemia.

ABSTRACT

Neuropathic pain, depression, and anxiety are common comorbidities in diabetic patients, often occurring concurrently. The pathophysiology of these diseases is considered multifactorial, however, hyperglycemia and oxidative stress (OS) seem to play a crucial role in their onset and development. Currently available pharmacological treatments have low effectiveness and present associated side effects, resulting in low compliance by patients. These facts demonstrate the need for alternative therapies for these patients. Bixin (BIX) is a fat-soluble diapocarotenoid, extracted from the seeds of *Bixa orellana*, a tree native to Brazil popularly known as Achiote. Different studies have shown promising results for this carotenoid in non-clinical models, particularly from its antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects. Based on the above, the aim of the present study was to investigate the effect of treatment with BIX on mechanical allodynia, depressive, and anxious-like behavior associated with experimental diabetes, as well as its involved mechanisms. For this, streptozotocin-induced diabetic rats were treated for 17 days (starting 14 days after diabetes induction) with vehicle, BIX (10, 30, or 90 mg/kg), or insulin (INS; 6UI; control positive). Mechanical allodynia, anxious and depressive-like behavior were assessed by electronic Von Frey, elevated plus-maze, and forced swimming tests, respectively. Locomotor activity was measured by the open field test. Blood glycated hemoglobin (HbA1) and indirect OS parameters (lipid peroxidation-LPO, reduced glutathione-GSH, catalase- CAT and superoxide dismutase-SOD) were evaluated in the hippocampus, pre-frontal cortex, lumbar spinal cord, and sciatic nerve. Diabetic animals developed mechanical allodynia, anxious and depressive-like behaviors, increased plasma HbA1, and an increase of indirect parameters of OS in the evaluated tissues. Acute and repeated BIX-treatment (at all doses) significantly attenuated mechanical allodynia in diabetic rats, while the repetitive treatment attenuated the anxious (all doses) and depressive-like behaviors (30 and 90 mg/kg), without changing the locomotor performance. BIX (all doses) or INS restored oxidative parameters in the analyzed tissues and reduced the plasma percentage of HbA1. The data obtained allow us to conclude that BIX, attenuating EO and hyperglycemia, may represent an alternative for the treatment of comorbidities associated with diabetes.

Keywords: *Bixa orellana*. Insulin. Streptozotocin. Diabetic comorbidities. Carotenoids. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA BIXINA.....	32
FIGURA 2 - DECURSO TEMPORAL DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	43
FIGURA 3 - EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	46
FIGURA 4 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	49
FIGURA 5 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DIABÉTICOS	51
FIGURA 6 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O PESO CORPORAL E PERCENTUAL DE HEMOGLOBINA GLICADA EM ANIMAIS DIABÉTICOS	53
FIGURA 7 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE OS NÍVEIS DE LPO EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	55
FIGURA 8- EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE OS NÍVEIS DE GSH EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	57
FIGURA 9 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A ATIVIDADE DA SOD EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	59
FIGURA 10 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A ATIVIDADE DA CAT EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	61

LISTA DE SIGLAS

AGEs – do inglês - *Advanced Glycation End-products*

BIX – Bixina

CAT – Catalase

CPF – Córtex Pré-Frontal

DBT – Diabético

DM1 – *Diabetes Mellitus* Tipo 1

DM2 – *Diabetes Mellitus* Tipo 2

DND – Dor Neuropática Diabética

EO – Estresse Oxidativo

GSH – Glutathiona Reduzida

GSSG – Glutathiona Oxidada

HbA1 – Hemoglobina Glicada

HIP – Hipocampo

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

IASP – do inglês – *International Association for the Study of Pain*

IDF – do inglês – *International Diabetes Federation*

INS – Insulina

ISRS – Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina

ISRSN – Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

LCE – Teste do Labirinto em Cruz Elevada

LOOH – Hidroperóxidos Lipídicos

LPO – Peroxidação Lipídica

ME – Medula Espinhal Lombar

NC – Nervo Ciático

NF – Teste de Natação Forçada

NGL – Normoglicêmico

NPH – do inglês - *Neutral Protamine Hagedorn*

PDS – Polineuropatia Distal Simétrica

RNS – do inglês – *Reactive Nitrogen Species*

ROS – do inglês – *Reactive Oxygen Species*

SBD – Sociedade Brasileira do Diabetes

SOD – Superóxido Dismutase

STZ – Estreptozotocina

TCA – Ácido Tricloroacético

VEI – Veículo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	DIABETES	12
1.1.1	Critérios Diagnósticos e Hemoglobina Glicada.....	14
1.2	COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES DO DIABETES	15
1.3	NEUROPATIA, DOR E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA.....	16
1.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA	20
1.5	DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES	21
1.6	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DOS TRANSTORNOS DE DEPRESSÃO E ANSIEDADE	25
1.7	RELAÇÃO ENTRE DOR NEUROPÁTICA, DEPRESSÃO, ANSIEDADE E DIABETES	27
1.8	ESTRESSE OXIDATIVO, COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES DO DIABETES.....	28
1.9	BIXINA.....	31
2.	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3.	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	ORIGEM DO MATERIAL BOTÂNICO	35
3.2	ANIMAIS	35
3.3	DROGAS	36
3.4	INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL.....	36
3.5	TRATAMENTO	36
3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS	37
3.6.1	Von Frey Eletrônico	37
3.6.2	Labirinto em Cruz Elevado.....	37
3.6.3	Teste do Nado Forçado	38
3.6.4	Teste do Campo Aberto.....	38
3.7	TESTES BIOQUÍMICOS.....	39
3.7.1	Preparação das Amostras	39

3.7.2	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)	39
3.7.3	Determinação dos níveis de glutathione reduzida (GSH)	40
3.7.4	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	40
3.7.5	Determinação da atividade da catalase (CAT)	40
3.7.6	Hemoglobina glicada	41
3.8	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM BIX OU INS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA EM RATOS DIABÉTICOS	45
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	48
4.3	EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DIABÉTICOS	50
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS SOBRE O PESO CORPORAL E PERCENTUAL DE HbA1 DE ANIMAIS DIABÉTICOS..	52
4.5	MEDIDAS INDIRETAS DE ESTRESSE OXIDATIVO	54
4.5.1	Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de LPO no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal lombar, e nervo ciático de animais diabéticos.....	54
4.5.2	Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal lombar, e nervo ciático de animais diabéticos.....	56
4.5.3	Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da SOD na medula espinhal lombar e nervo ciático de animais diabéticos	58
4.5.4	Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da CAT na medula espinhal lombar e nervo ciático de animais diabéticos	60
5.	DISCUSSÃO.....	62
6.	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

Anexo 1 – CEUA/BIO N° 1294	89
----------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (IDF – *International Diabetes Federation*, 2019), o diabetes *mellitus* é definido como uma doença metabólica crônica que ocorre devido à incapacidade do pâncreas em produzir insulina, ou à inaptidão do corpo em utilizar adequadamente a insulina produzida. Em ambos os casos ocorre aumento dos níveis sanguíneos de glucose, os quais podem promover danos em órgãos, vasos sanguíneos e nervos (SBD – Sociedade Brasileira do Diabetes; 2019). Atualmente, estima-se que cerca de 463 milhões de pessoas sejam diabéticas em todo o mundo, gerando gastos com saúde estimados em 760 bilhões de dólares, no ano de 2019 (IDF, 2019). No Brasil, mais de 13 milhões de pessoas convivem com essa doença, representando cerca de 7% da população do país (SBD, 2019).

O diabetes é classificado em três tipos principais. O tipo 1 (DM1), também conhecido como insulino dependente, atinge aproximadamente 10% dos pacientes e ocorre majoritariamente devido a uma reação autoimune, na qual o sistema de defesa do organismo ataca as células β -pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Como consequência ocorre uma deficiência acentuada desse hormônio no organismo. Acredita-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuam para o seu desenvolvimento. O diabetes do tipo 2 (DM2) representa cerca de 90% de todos os casos de diabetes, sendo assim considerado o tipo mais comum da doença. É caracterizado pela resistência à insulina, situação na qual o corpo não consegue utilizar o hormônio de forma satisfatória devido a sua produção inadequada ou insuficiente. Sua ocorrência está amplamente associada à obesidade, sedentarismo e maus hábitos alimentares. Já o diabetes gestacional é uma condição temporária em que ocorre o aumento dos níveis de glucose sanguíneos durante a gestação, os quais costumam se reestabelecer após o parto. Essa condição afeta cerca de 4% das gestantes, podendo levar a complicações fetais, além de aumentar a chance de que a gestante e o feto desenvolvam diabetes posteriormente (IDF, 2019; SDB, 2019).

De particular interesse para o presente estudo, o DM1 pode se desenvolver em qualquer idade, entretanto, acomete de forma mais frequente crianças e jovens, afetando atualmente mais de um milhão de indivíduos (IDF, 2019). Pacientes diagnosticados com DM1 necessitam de tratamento farmacológico diário com insulina (INS) exógena, para o controle da glicemia e sobrevivência. Atualmente diferentes formulações de INS estão disponíveis no mercado para atender as necessidades específicas dos pacientes, diferindo entre si em relação ao tempo de início da ação farmacológica, tempo total de duração e pico plasmático. A classe de análogos de INS de ação rápida, compreende fármacos com rápido início de ação (15-30 min), mas curta duração de atividade farmacológica (4-5 h), como Lispro (Humalog®) e Aspart (NovoRapid®). Já análogos de INS de ação intermediária, compreendem os fármacos com início de ação de ação entre 1 a 2 h, e duração de atividade farmacológica de 10 a 16 h, como a NPH (do inglês – *Neutral Protamine Hagedorn*). Por fim, análogos de INS de ação prolongada apresentam início de ação em torno de 2 h, e duração de atividade farmacológica de até 36 h, como Detemir (Levemir®) (AHMAD, 2014; FREELAND, 2016; THEVIS et al., 2010).

Considerando indivíduos adultos, a epidemiologia do DM1 é significativamente reduzida. Isso ocorre especialmente porque em muitos casos torna-se difícil a diferenciação entre os tipos de diabetes, quando não descoberto na infância (MAAHS et al., 2010). Assim, diversos estudos sugerem que aproximadamente 15% dos pacientes adultos diagnosticados com DM2, na verdade apresentem anticorpos contra as ilhotas pancreáticas. Esses indivíduos também apresentam destruição das células β , entretanto, de maneira muito mais lenta em comparação aos pacientes mais jovens, o que frequentemente promove um atraso no diagnóstico e na terapia medicamentosa correta desses pacientes (ATKINSON et al., 2014; MAAHS et al., 2010). Portanto, alguns autores consideram subestimada a epidemiologia do DM1 (ATKINSON et al., 2014; HOLMSTRÖM et al., 2018; MATEJKO et al., 2018).

Além disso, dados de estudos epidemiológicos em todo o mundo indicam que a incidência de DM1 vem aumentando de 2 a 5% ao ano, e preveem que essa porcentagem dobre até o fim da década (ATKINSON et al., 2014; MAAHS et al., 2010). As razões para esse aumento ainda não estão

completamente elucidadas, porém acredita-se que fatores não genéticos estejam intimamente relacionados. Dentre esses, aspectos ambientais como mudanças no estilo de vida, dietas alimentares e menor incidência de infecções microbianas (hipótese da higiene) estão sendo considerados como fatores de risco para essa condição (ATKINSON et al., 2014; BARAT et al., 2008; MAAHS et al., 2010; RØNNINGEN et al., 2014).

1.1.1 Critérios Diagnósticos e Hemoglobina Glicada

Atualmente, segundo a SBD (Diretrizes SBD, 2015), três critérios são aceitos para o diagnóstico de diabetes *mellitus*:

- 1) Observação dos sintomas clássicos da doença: poliúria (micção excessiva), polidipsia (sede excessiva) e perda de peso, associados à glicemia casual (realizada a qualquer hora do dia) superior a 200 mg/dl;
- 2) Glicemia em jejum igual ou superior a 126 mg/dl (7 mmol/L);
- 3) Glicemia superior a 200 mg/dl após 2 h de sobrecarga de 75 g de glucose.

Desde 1997 esses critérios foram propostos pela ADA (*American Diabetes Association*) e aceitos pela SBD e OMS (Organização Mundial de Saúde) com a finalidade de realizar corretamente o diagnóstico da doença e, dessa forma, prevenir a instalação e progressão das complicações micro e macrovasculares do diabetes, discutidas a seguir. Além desses critérios, desde 2009 a ADA propõe a utilização da hemoglobina glicada (HbA1) como uma forma adicional de critério diagnóstico do diabetes (Diretrizes SBD, 2015; MAGALHÃES et al., 2012).

A HbA1 compreende um conjunto de substâncias formadas a partir da reação da hemoglobina A (HbA) à açúcares (MAGALHÃES et al., 2012). HbA1a, HbA1b, e HbA1c são os três subtipos cromatográficos que podem ser encontrados clinicamente, sendo chamados de maneira ampla de HbA1 (NATHAN et al., 2008). Para sua formação química, é necessário que ocorra reação de glicação, a qual consiste na adição não-enzimática de um açúcar à grupamentos amino de proteínas. Diversas proteínas corporais estão passíveis de sofrerem glicação, contribuindo assim para a geração dos produtos finais da glicação avançada (*Advanced Glycation End products* – AGEs), discutidos a seguir. Entretanto, a proteína mais utilizada clinicamente para monitorar a

glicemia a partir desse processo, é a hemoglobina (SACKS, 2003). Como o eritrócito é altamente permeável à glucose, a porcentagem de hemoglobina glicada é proporcional à concentração sanguínea desse açúcar durante o tempo de meia-vida da célula (aproximadamente 120 dias). Dessa forma, a avaliação do %HbA1 permite a obtenção de valores de glicemia a longo prazo, refletindo a exposição glicêmica de 2 a 3 meses anteriores à coleta de sangue, sofrendo baixa interferência por alterações agudas de glicemia (KILPATRICK, 2018; SAUDEK; BRICK, 2009) (MAGALHÃES et al., 2012; SACKS, 2003).

Segundo a diretriz proposta pela SBD (2015), são considerados diabéticos os pacientes que apresentam %HbA1 superior a 6,5 (48 mmol/mol). Pacientes com percentual de 5,7 à 6,4 são classificados como pré-diabéticos, e apresentam maiores chances de desenvolverem o diabetes a curto prazo (MAGALHÃES et al., 2012). Já concentrações de HbA1 iguais ou superiores a 7% de forma persistente, estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de complicações diabéticas, especialmente as microvasculares (KILPATRICK, 2018; MAGALHÃES et al., 2012). Dessa forma, recomenda-se que pacientes diabéticos realizem o teste de HbA1 a cada três meses, possibilitando assim o manejo e ajuste da estratégia terapêutica (KILPATRICK, 2018; NATHAN et al., 2008).

1.2 COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES DO DIABETES

Tanto o DM1 quanto o DM2 tem o potencial de causar diversas complicações de saúde, as quais são responsáveis por significativa morbidade e mortalidade (PAPATHEODOROU et al., 2018). A patogênese das complicações diabéticas ainda não está completamente elucidada, entretanto, sabe-se que a hiperglicemia a longo prazo exerce um papel significativo nesse processo, especialmente por promover extenso estresse oxidativo (EO) e consequentemente danos em diversos vasos e tecidos (FORBES; COOPER, 2013). Dessa forma, pacientes com pobre gerenciamento glicêmico exibem maior incidência dessas doenças (BAYNES AND THORPE, 1999; IDF, 2019). Atualmente, estima-se que metade dos pacientes diabéticos mundiais não possuem o diagnóstico da doença, estando assim mais propensos ao

desenvolvimento de complicações devido a falta de manejo terapêutico (PAPATHEODOROU *et al.*, 2018; IDF, 2019).

As complicações crônicas do diabetes são amplamente divididas em dois grupos principais: microvasculares, quando são decorrentes de danos em pequenos vasos sanguíneos, ou macrovasculares, quando ocorrem devido a danos em vasos de grande calibre (DESHPANDE *et al.*, 2008; FORBES; COOPER, 2013). A retinopatia, nefropatia e, de particular interesse para o presente estudo, neuropatia, são exemplos de complicações microvasculares. Já doença cardiovascular, doença arterial periférica e o acidente vascular cerebral, são exemplos de complicações macrovasculares do diabetes (DESHPANDE *et al.*, 2008; TESFAYE *et al.*, 2013).

Além das complicações físicas, o diabetes *mellitus* também está associado ao desenvolvimento e aumento da prevalência de comorbidades psicológicas, especialmente a depressão e ansiedade (BICKETT; TAPP, 2016; ZANOVELLI *et al.*, 2016). Considerando que esses transtornos mentais apresentam alta incidência na população e afetam negativamente o controle glicêmico do paciente, cada vez mais os médicos reconhecem a importância do tratamento farmacológico e apoio psicológico para os diabéticos e seus familiares (ADILI *et al.*, 2006).

Pacientes diabéticos que desenvolvem complicações e comorbidades apresentam baixa qualidade de vida, maior utilização dos recursos de assistência médica e, conseqüentemente, maiores gastos com saúde (BOULANGER *et al.*, 2009). Estima-se que mais de 50% dos custos diretos de saúde desses pacientes sejam direcionados ao tratamento das complicações e comorbidades diabéticas. Além disso, custos indiretos em decorrência da baixa produtividade ao trabalho, por exemplo, acrescentam um aumento de 35% às despesas associadas a essa condição (IDF, 2019). Esses fatores ressaltam a necessidade de intervenção terapêutica e de estudos que promovam um melhor entendimento da fisiopatologia das doenças associadas ao diabetes.

1.3 NEUROPATIA, DOR E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A neuropatia é definida como um distúrbio de função ou alteração patológica em fibras nervosas, que pode ser desenvolvida em decorrência de

diversas doenças. É classificada como mononeuropatia quando afeta um nervo, mononeuropatia multiplex quando afeta vários nervos, ou polineuropatia quando apresenta característica difusa e bilateral (*International Association for the Study of Pain – IASP*, 2017). A neuropatia diabética, considerada a complicação crônica mais comum e incapacitante do diabetes, pode se manifestar na divisão somática e/ou autônoma do sistema nervoso periférico (SNP). Embora existam diversos tipos de neuropatias diabéticas, a polineuropatia distal simétrica (PDS) é considerada sua forma mais prevalente, afetando cerca de 90% dos pacientes (ABBOTT et al., 2011; TESFAYE et al., 2013; ZIEGLER, 2008).

A PDS é caracterizada como um processo crônico, simétrico e dependente de comprimento, capaz de promover uma perda progressiva de fibras nervosas. O início dessa doença costuma ser gradual, apresentando sintomas sensoriais que se iniciam nos dedos dos pés e progressivamente se distribuem para os pés e pernas. Posteriormente, mãos e braços costumam ser afetados, gerando um padrão de distribuição conhecido como luva e bota. Aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados apresentam sintomas neuropáticos positivos, como sensações de formigamento, agulhadas ou choques elétricos. Porém, dentre todos os sintomas associados considera-se a dor neuropática como um dos mais debilitantes, estando presente em até 26% dos pacientes (ABBOTT et al., 2011; MORALES-VIDAL et al., 2012; SCHREIBER et al., 2015; TESFAYE et al., 2013).

A dor é definida pela IASP (2020) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante aquela associada a, dano real ou potencial do tecido. É considerada uma sensação subjetiva de cada indivíduo, resultado tanto da nocicepção, ou seja, da codificação do estímulo nocivo pelos nociceptores, quanto do processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). A nocicepção tem sua transmissão iniciada em terminações de uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas de nociceptores. Essas células são neurônios sensoriais pseudounipolares, que possuem seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, apresentando uma ramificação axonal periférica que inerva o órgão-alvo, e uma ramificação central que inerva a medula espinhal (BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores são divididos em duas classes principais. As fibras A δ , de diâmetro intermediário, são relativamente pequenas (1-6 μ m), finamente mielinizadas e podem conduzir o estímulo nocivo de forma relativamente rápida (6 a 30 m/s). A maior parte dessas fibras está associada a termo ou mecanorreceptores. Já as fibras C são não-mielinizadas, pequenas (abaixo de 1,5 μ m) e conduzem o estímulo nocivo de forma mais lenta (0.5 a 2 m/s). São amplamente associadas a receptores polimodais, respondendo assim a estímulos químicos, mecânicos e térmicos (BASBAUM et al., 2009; BOURNE et al., 2014).

Quando esses receptores são ativados, promovem alterações na membrana do nociceptor (aferente primário) e conseqüentemente a deflagração do potencial de ação. Esse estímulo elétrico é conduzido pelo axônio até a matéria cinzenta do corno dorsal da medula, induzindo a liberação de vários neurotransmissores excitatórios, responsáveis pela ativação dos receptores no terminal pós-sináptico (ROCHA et al., 2007; SCHAIBLE, 2004). Em seguida, uma subpopulação de neurônios transmite essa informação para o córtex somatossensorial através do tálamo, fornecendo informações sobre a localização e intensidade do estímulo nociceptivo. Outra subpopulação de neurônios envolve o córtex cingulado e insular, através de conexões no núcleo parabraqueal e amígdala, onde os aspectos afetivos e emocionais são adicionados à percepção de dor (BASBAUM et al., 2009; DINAKAR; STILLMAN, 2016; KWON et al., 2013).

Existe ainda um mecanismo de controle descendente, capaz de modular negativamente esses estímulos nociceptivos. Essas vias descendentes incluem várias estruturas do sistema nervoso central (SNC), como o bulbo ventromedial rostral (RMV), a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o corno dorsal da medula (DH), os quais formam uma via descendente do sistema modulador da dor muito estudado, conhecido como PAG-RMV-DH. Os efeitos modulatórios dessa via são amplamente mediados pelas vias descendentes monoaminérgicas, utilizando neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e dopamina (BOURNE et al., 2014; KWON et al., 2013).

Dependendo do início e duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda frequentemente apresenta um início repentino

após um estímulo externo, normalmente como resultado de um dano, injúria ou inflamação tecidual, tendo assim um forte caráter protetor associado. Esse tipo de dor perdura por um pequeno período de tempo, apresentando assim uma duração limitada. Por outro lado, a dor crônica é caracterizada por persistir durante longos períodos de tempo, e em muitos casos sua causa é difícil de ser determinada. Esse tipo de dor perde o caráter protetor associado por ser persistente e contínua, afetando aspectos cotidianos do paciente e podendo levar a problemas físicos, psicológicos e sociais. Dessa forma, a dor crônica não apresenta valor adaptativo aparente e necessita de tratamento (BASBAUM et al., 2009; KWON et al., 2013; RADNOVICH et al., 2014).

A dor neuropática diabética (DND) é um tipo de dor crônica caracterizada por sintomas de dor espontânea (na ausência de estímulo), parestesias e disestesias, associadas à alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos) e/ou hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) (SCHREIBER et al., 2015; TESFAYE et al., 2013). Esses sintomas são distais, simétricos, considerados de moderados a severos, e frequentemente pioram durante a noite, afetando diretamente o sono, humor, atividades diárias e, conseqüentemente, a qualidade de vida do paciente (KULKANTRAKORN; LORSUWANSIRI, 2013).

Os mecanismos patofisiológicos que levam ao desenvolvimento da DND, ainda não estão completamente elucidados. Estudos clínicos e eletrofisiológicos prévios confirmam que a severidade da DND, nem sempre está diretamente relacionada com a gravidade do diabetes ou com o grau de envolvimento de grandes fibras sensoriais, podendo inclusive ocorrer na ausência de injúria nervosa (FELDMAN et al., 2017; SCHREIBER et al., 2015). Entretanto, existe um consenso de que os efeitos tóxicos da hiperglicemia a longo prazo exercem um papel importante para o desenvolvimento dessa complicação, especialmente por desencadear extenso EO (JENSEN et al., 2006; KULKANTRAKORN; LORSUWANSIRI, 2013; SCHREIBER et al., 2015). Além da hiperglicemia, diversos estudos demonstram que distúrbios imunológicos e metabólicos, mudanças na expressão de canais iônicos, alterações em vasos sanguíneos que suprimem os vasos periféricos, e mecanismos de dor centrais envolvendo o desbalanço entre as vias inibitórias e

facilitatórias, possam estar ao menos parcialmente relacionados à dor crônica decorrente do diabetes (BAYNES; THORPE, 1999; SCHREIBER et al., 2015).

1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Em geral, a DND não responde bem aos fármacos utilizados para o tratamento da dor aguda e, com exceção dos medicamentos voltados ao controle glicêmico, seu tratamento farmacológico é apenas sintomático e não associado aos mecanismos patofisiológicos da doença (SCHREIBER et al., 2015). Embora existam apenas dois medicamentos (duloxetina e pregabalina) aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e EMA (*European Medicines Agency*) para o seu tratamento, drogas de diferentes classes farmacológicas tem sido utilizadas como alternativas terapêuticas, em decorrência da eficácia limitada que esses medicamentos apresentam sobre essa doença (JENSEN et al., 2006; TESFAYE et al., 2013). Dentre esses, os antidepressivos e anticonvulsivantes são considerados como primeira linha de tratamento, e adesivos tópicos de lidocaína e capsaicina como segunda linha. Já o uso de opioides é recomendado somente como terceira linha de tratamento, devido aos efeitos adversos promovidos por seu uso contínuo, como constipação, dependência e tolerância (GILRON et al., 2015; SCHREIBER et al., 2015).

Os antidepressivos tricíclicos foram utilizados como primeira linha de tratamento para a dor neuropática durante muitos anos, entretanto, seu uso se tornou mais restrito devido aos frequentes efeitos colaterais e eficácia limitada (Ziegler, 2008). Dessa forma, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN), como a duloxetina e a venlafaxina, têm sido mais utilizados para o manejo da DND. Esses medicamentos aliviam a dor por promoverem aumento da disponibilidade sináptica de noradrenalina e serotonina nas vias descendentes, modulando negativamente o impulso doloroso. Seus efeitos adversos frequentemente apresentam intensidade moderada e incluem sonolência, náusea, constipação, boca seca e tontura (BARRETT et al., 2007; TESFAYE et al., 2013; ZIEGLER, 2008).

Dentre os anticonvulsivantes, a gabapentina e pregabalina frequentemente são consideradas as drogas de escolha para o tratamento da DND, especialmente por apresentarem maior eficácia e efeitos adversos menos significativos em relação à carbamazepina, por exemplo (JENSEN et al., 2006; TESFAYE et al., 2013). Considerados análogos estruturais de GABA, um neurotransmissor inibitório, esses medicamentos são efetivos para o tratamento da dor por se ligarem a uma subunidade específica do canal de cálcio no cérebro e na medula. Consequentemente, promovem diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios nessas localidades, os quais são importantes para a transmissão do estímulo nociceptivo. Alguns autores propõem ainda que a ligação desses gabapentinóides aos canais de cálcio promova diminuição da expressão do canal iônico, o que também pode contribuir para seu efeito analgésico. Seus principais efeitos colaterais incluem tontura, sonolência, edema periférico, dores de cabeça e ganho de peso (SCHREIBER et al., 2015; TESFAYE et al., 2013; ZIEGLER, 2008).

Diversos estudos indicam que essas abordagens terapêuticas não promovem controle satisfatório da dor, de forma que menos de um terço dos pacientes descreve alívio superior a 50% da DND (JENSEN et al., 2006; SCHREIBER et al., 2015; WALDFOGEL et al., 2017). Além disso, esses tratamentos geram custos diretos estimados em R\$ 10.000,00/ano por pessoa, que podem ser ainda maiores em pacientes que apresentam dor de intensidade moderada a severa (50% dos casos) (BARRETT et al., 2007). Dessa forma, o tratamento farmacológico da DND continua sendo um desafio para a prática clínica, tornando-se vital a busca por novas alternativas terapêuticas, especialmente direcionadas aos mecanismos patofisiológicos da doença, e não apenas sintomáticos.

1.5 DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES

O Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais, na sua quinta edição feita pela Associação de Psiquiatria Americana (DMS-V, 2013), define os transtornos mentais como uma síndrome caracterizada por alterações clinicamente significativas de fatores cognitivos, emocionais ou comportamentais, que refletem em uma disfunção no comportamento

psicológico, biológico ou em processos de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental.

Atualmente, fatores biológicos, psicológicos e sociais são reconhecidos como desencadeadores dos transtornos mentais. Dentre os biológicos, algumas doenças crônicas como o HIV (*human immunodeficiency virus*), câncer e diabetes estão amplamente associadas ao aumento da prevalência de desordens psiquiátricas (OPIO et al., 2018; WALVISCH, 2017). Em relação ao diabetes, diversos estudos epidemiológicos demonstram a depressão como a comorbidade psiquiátrica associada mais frequente, apresentando uma prevalência de duas a três vezes maior do que a população em geral. Em segundo lugar aparecem os transtornos de ansiedade, que frequentemente ocorrem de forma concomitante à depressão, afetando duas vezes mais os pacientes diabéticos em comparação à população normoglicêmica (BUCHBERGER et al., 2016; BYSTRITSKY et al., 2014; JAIN et al., 2011; NAICKER et al., 2017).

Assim como a depressão e a ansiedade, a prevalência do diabetes e suas complicações aumentou exponencialmente durante os últimos 50 anos, e continua aumentando em uma trajetória ascendente. Consequentemente, acredita-se que o percentual de pacientes com diabetes, depressão e ansiedade de forma concomitante, aumente significativamente até a próxima década (JAIN et al., 2011; KHALIGHI et al., 2019; NAICKER et al., 2017).

Segundo a OMS, a depressão é considerada uma das condições mais incapacitantes do mundo. A característica comum dos transtornos depressivos é a presença de humor triste, vazio ou irritável acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo. Esses transtornos podem ser classificados em oito tipos principais, sendo o transtorno depressivo maior considerado o representante da condição clássica desse grupo. Para ser diagnosticado, pelo menos cinco dos seguintes sintomas devem estar presentes, por no mínimo duas semanas de duração: humor deprimido na maior parte do dia; acentuada diminuição do interesse ou prazer; perda ou ganho significativo de peso; insônia ou hipersonia; agitação ou retardo psicomotor; fadiga; sentimentos de inutilidade ou culpa; diminuição da capacidade de pensar ou se concentrar; e pensamentos recorrentes de morte. Para o correto diagnóstico pelo menos um

dos cinco sintomas deve ser humor deprimido ou perda de interesse ou prazer (DMS-V, 2013).

A patofisiologia dos transtornos depressivos é multifatorial, não estando completamente elucidada. Atualmente as teorias que visam explicar a fisiopatologia da depressão incluem a hipótese das aminas biogênicas, a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), e a associação de fatores genéticos e ambientais (para revisão veja DUMAN *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2010; JESULOLA *et al.*, 2017). Outros fatores que podem contribuir nesse processo incluem a diminuição da neurogênese hipocampal; fatores imunológicos que levam ao aumento da secreção de citocinas inflamatórias; aumento dos níveis do fator de liberação de corticotrofina; e anormalidades nos sistemas de segundos mensageiros (JESULOLA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2010; MAES *et al.*, 2011; MALYKHIN; COUPLAND, 2015).

Já os transtornos de ansiedade, segundo o DMS-V, se caracterizam pela presença de medo e ansiedade excessivos, além de perturbações comportamentais relacionadas. Esses sintomas são importantes fisiologicamente, mas perdem o caráter adaptativo devido a sua intensidade e persistência além de períodos apropriados, tornando-se patológicos (GELFUSO *et al.*, 2014). Os transtornos de ansiedade podem ser classificados em oito tipos principais, entretanto, o foco do presente estudo é o transtorno de ansiedade generalizada, caracterizado pela ansiedade e preocupação excessiva em diferentes âmbitos sociais. Para ser diagnosticado, pelo menos três dos seguintes sintomas devem estar presentes por no mínimo seis meses de duração: inquietação; fadiga; dificuldades de concentração; irritabilidade; tensão muscular; e perturbações do sono. Dependendo do sintoma associado, o período necessário para considerar o diagnóstico, pode variar caso a caso (DMS-V, 2013).

A patogênese das desordens de ansiedade também é multifatorial, envolvendo interações complexas entre fatores biológicos, influências ambientais e mecanismos psicológicos. As principais alterações fisiológicas que visam explicar a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade incluem: a desregulação do eixo HPA; alterações na liberação e expressão de receptores para colecistoquinina; e a alteração da liberação e/ou recaptação de monoaminas, peptídeos, e aminoácidos, especialmente sobre o sistema

límbico e córtex pré-frontal. Além disso, sabe-se que fatores genéticos e ambientais, particularmente através de mecanismos epigenéticos, exercem forte influência sobre a gênese e manutenção dessa doença (BRAGA *et al.*, 2010; GELFUSO *et al.*, 2014; BABAEV *et al.*, 2018; SCHIELE; DOMSCHKE, 2018)

Diversos estudos demonstram a existência de uma ligação biológica entre o diabetes e essas desordens psiquiátricas associadas. Embora a correlação positiva entre essas doenças não esteja associada a fatores genéticos, sabe-se que diferentes fatores ambientais podem ativar vias patofisiológicas comuns (BADESCU *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2011). O estresse crônico, por exemplo, ativa o eixo HPA e o sistema nervoso simpático promovendo aumento da produção de cortisol, adrenalina e noradrenalina, nas glândulas suprarrenais. Altos níveis de cortisol de forma crônica, associados à ativação prolongada do SNS, perturbam a via de sinalização decorrente da ligação da insulina ao seu receptor celular. Esse efeito pode desencadear a resistência à insulina, levando ao desenvolvimento do diabetes (BADESCU *et al.*, 2016; RUBIN *et al.*, 2008; SEMENKOVICH *et al.*, 2015). Evidenciando ainda mais a ligação biológica entre essas doenças, sabe-se que o aumento da produção desses e outros hormônios promove a ativação do sistema do medo, podendo levar ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade. Da mesma forma, transtornos depressivos podem ser desencadeados pelo excesso de cortisol a longo prazo, devido ao desenvolvimento de distúrbios na neurogênese hipocampal e taquifilaxia do sistema de recompensa (BADESCU *et al.*, 2016; BRUEHLA *et al.*, 2014).

Além disso, o estresse crônico pode promover o aumento significativo da produção de citocinas inflamatórias. Essas, associadas aos auto-anticorpos presentes em pacientes com DM1, antecipam o aparecimento da doença por afetarem negativamente o funcionamento das células β -pancreáticas. A falta de insulina interfere na neurogênese e no metabolismo de diversos neurotransmissores. Como resultado, ocorrem interferências na plasticidade sináptica, funções neuroendócrinas e comportamento, propiciando assim o desenvolvimento de transtornos como a depressão e a ansiedade. Além disso, a hiper e hipoglicemia promovidas pelas alterações nos níveis de insulina, também promovem a hiperatividade do eixo HPA, gerando assim um círculo

vicioso (BADESCU et al., 2016; JAIN et al., 2011; RÉUS et al., 2017; SEMENKOVICH et al., 2015).

Acredita-se que fatores ambientais comuns nessas doenças como a má alimentação, falta de exercícios físicos, sono de baixa qualidade, e aumento da frequência de hospitalizações, possam ser os responsáveis por ativar os mecanismos fisiológicos comuns entre o diabetes, depressão e ansiedade (BADESCU et al., 2016; MEZUK et al., 2008). Por esses e outros motivos, considerando que a depressão e a ansiedade podem aumentar as chances do paciente desenvolver o diabetes e suas complicações, assim como o diabetes pode levar ao desenvolvimento de depressão e ansiedade, vem sendo amplamente aceito na literatura a existência de uma relação bidirecional entre essas desordens (BADESCU et al., 2016; BAIR et al., 2010; JAIN et al., 2011; SEMENKOVICH et al., 2015). A interação entre essas doenças é reconhecida como potencialmente problemática, já que uma condição influencia negativamente a outra, resultando em menor adesão ao tratamento, piora do controle glicêmico e da saúde mental, além dos sintomas decorrentes do diabetes (COHEN et al., 2019; NAICKER et al., 2017).

1.6 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DOS TRANSTORNOS DE DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Os antidepressivos chamados de segunda geração, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN), são considerados a primeira linha de tratamento para o transtorno depressivo maior e para os transtornos de ansiedade. Esses medicamentos apresentam efeitos terapêuticos sobre ambas doenças, o que representa uma vantagem já que essas frequentemente ocorrem de forma concomitante (GARTLEHNER et al., 2017; THIBAUT, 2017). Todos apresentam um mecanismo de ação similar, seletivamente bloqueando 60-80% da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina, levando ao aumento seletivo desses neurotransmissores na fenda sináptica (FLECK et al., 2009; LOCHMANN; RICHARDSON, 2018).

Dentre esses medicamentos, a sertralina, o escitalopram e a fluoxetina são as drogas mais prescritas para o tratamento da depressão e ansiedade

associada ao diabetes, especialmente por apresentarem efeitos benéficos sobre o controle glicêmico, hemoglobina glicada, resistência à insulina e peso corporal (LOCHMANN; RICHARDSON, 2018; ZANOVELI et al., 2016). Por outro lado, os antidepressivos tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase (MAO) e os inibidores da recaptação de dopamina são considerados como segunda ou terceira linha para o tratamento desses transtornos associados ao diabetes. Isso ocorre especialmente devido aos efeitos colaterais associados a essas medicações, como ganho de peso, aumento da glicemia, e aumento das chances de desenvolvimento do DM2, além dos efeitos adversos acentuados. Dentre estes, destacam-se a convulsão, perda de coordenação motora precisa e hipotensão postural (LUSTMAN et al., 1997; ZANOVELI et al., 2016; SEMENKOVICH et al., 2015). Vale ressaltar ainda que atualmente não se recomenda a utilização de benzodiazepínicos para o tratamento da ansiedade, especialmente devido aos efeitos colaterais associados, como tolerância, dependência, maiores riscos de suicídio, e desenvolvimento de demência (THIBAUT, 2017).

A resposta clínica do paciente frente ao tratamento costuma demorar de duas a quatro semanas, entretanto, os efeitos adversos se iniciam concomitantemente a utilização dos medicamentos. Dentre esses, sedação, náuseas, dores de cabeça, insônia, sonolência, diarreia, tontura e boca seca estão entre os mais frequentemente descritos, os quais são particularmente angustiantes para o paciente que já se encontra em um quadro depressivo/ansioso (para revisão veja READ et al., 2017). Além disso, diferentes estudos demonstram que a resposta desses transtornos ao tratamento farmacológico é considerada moderada, sendo efetiva em apenas 50% dos pacientes. Entretanto, a remissão dos sintomas só é encontrada em 30% desses. Dessa forma, cerca de 40% dos pacientes mostram-se resistentes ao tratamento farmacológico, não apresentando melhora significativa do quadro psicológico mesmo com múltiplas intervenções terapêuticas, o que contribui significativamente para a baixa adesão ao tratamento (CAREK et al., 2011; LANG; BORGWARDT, 2013; MACQUEEN et al., 2017).

Outro aspecto importante é que a associação de medicamentos antidepressivos de escolha para pacientes diabéticos deve ser feita com

cautela, visto que muitos podem influenciar diretamente o controle glicêmico, interagir com drogas hipoglicemiantes, aumentar as chances de desenvolvimento de DM2, além de promover ganho de peso (LUSTMAN et al., 1997; MCINTYRE et al., 2006; MELKERSSON; DAHL, 2003; ZANOVELI et al., 2016). Torna-se assim, evidente a necessidade de se pesquisar novos fármacos que sejam eficazes e seguros para o tratamento da depressão e ansiedade, especialmente quando associadas ao diabetes.

1.7 RELAÇÃO ENTRE DOR NEUROPÁTICA, DEPRESSÃO, ANSIEDADE E DIABETES

A DND é conhecida por afetar negativamente o funcionamento psicossocial, potencialmente levando a incapacidade funcional para atividades básicas. Consequentemente, pacientes diagnosticados com essa doença apresentam um grande impacto em suas atividades no âmbito social, recreacional e trabalhista, o que afeta substancialmente a qualidade de vida dos mesmos. Por esses e outros motivos, diferentes estudos demonstram que a prevalência da depressão e ansiedade é maior nos pacientes com a DND, em comparação aos pacientes diabéticos que não apresentam dor (BOULANGER et al., 2009; GEELEN et al., 2017; GORE et al., 2005; JAIN et al., 2011).

Nesse sentido, algumas meta-análises multicêntricas sugerem que aproximadamente 60% dos pacientes diagnosticados com DND apresentam transtornos de depressão ou ansiedade, de intensidade pelo menos moderada. Dentre esses, cerca de 30% apresentam esses transtornos de forma concomitante (GORE et al., 2005; NARANJO et al., 2019). Apesar da crescente evidência de correlação entre a DND e os transtornos mentais associados, diversos estudos sugerem que os casos de DND associados à comorbidades mentais sejam subnotificados e/ou sub-registrados, sugerindo que a prevalência dessas doenças de forma simultânea seja ainda maior (BOULANGER et al., 2009; GORE et al., 2005; JAIN et al., 2011; NARANJO et al., 2019).

Assim, para ser eficaz, o tratamento da DND deve ser feito o quanto antes, levando em consideração o risco associado do desenvolvimento de

depressão e ansiedade e seus possíveis impactos múltiplos no alívio da dor, autogestão do paciente, qualidade de vida e prognóstico. O mesmo vale para o gerenciamento da depressão e ansiedade associadas ao diabetes, as quais podem favorecer o aparecimento de comorbidades diabéticas, como a DND (D'AMATO et al., 2016; DZIEMIDOK, 2015).

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO, COMPLICAÇÕES E COMORBIDADES DO DIABETES

Diversos estudos sugerem que a hiperglicemia a longo prazo exerce um papel significativo sobre a fisiopatologia das complicações e comorbidades associadas ao diabetes. Sabe-se que o estado hiperglicêmico pode promover danos teciduais através de diferentes mecanismos como formação de AGEs, disfunções mitocondriais, aumento do fluxo de açúcares através da via dos polióis, hiperatividade da proteína quinase C e da via da hexosamina, e pela atividade alterada de citocinas e fatores de crescimento. Todos esses mecanismos estão associados à geração de ROS (*Reactive Oxygen Species* – do inglês - Espécies Reativas de Oxigênio) e/ou RNS (*Reactive Nitrogen Species* – do inglês Espécies Reativas de Nitrogênio) (BAYNES; THORPE, 1999; IGHODARO, 2018; JAIN et al., 2011; OBROSOVA, 2002; PENNATHUR; HEINECKE, 2004; PICONI et al., 2003; WEI et al., 2009). Essas espécies são altamente reativas e ocorrem naturalmente como consequência da produção de energia celular, apresentando funções celulares úteis como a sinalização redox. Entretanto, quando estão em concentrações elevadas estimulam uma cascata de eventos que culminam em EO, e consequentemente dano tecidual (CARILLON *et al.*, 2013).

O EO ocorre quando há um distúrbio no balanço entre a produção de radicais livres (como ROS e RNS) e mecanismos de defesas antioxidantes. Superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) são espécies reativas importantes para a fisiologia do organismo, mas em altas concentrações danificam diversas macromoléculas, como DNA, lipídeos de membrana e proteínas (VINCENT et al., 2004). Uma das consequências mais estudadas desse processo é a peroxidação lipídica (LPO), definida como uma cascata de eventos bioquímicos que provocam a oxidação de lipídios poli-

insaturados, presentes nas membranas celulares e algumas organelas (YIN et al., 2011). Esses ácidos graxos são particularmente suscetíveis ao ataque das espécies reativas devido à presença da dupla ligação, a qual enfraquece a ligação carbono-hidrogênio no átomo de carbono adjacente. Quando ocorre o contato com as espécies reativas, há alteração das características moleculares dos ácidos graxos tornando-os mais hidrossolúveis. Como consequência há alteração da estrutura e funcionamento da membrana. Uma vez iniciada, ocorre uma reação em cadeia que se propaga automaticamente, amplificando o efeito das espécies reativas. Dessa forma, a LPO pode promover efeitos profundos na função celular a partir de alterações de fluidez, permeabilidade, potencial de membrana e eventualmente apoptose (BETTERIDGE, 2000; PICONI et al., 2003; SIES, 2015; YIN et al., 2011).

Para prevenir o dano oxidativo e proteger os componentes celulares contra a ação oxidante das espécies reativas, o organismo conta com uma rede complexa de agentes antioxidantes. Esses são definidos como qualquer composto que possa doar pelo menos um átomo de hidrogênio para um radical livre. Podem ser classificados como enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou não-enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) (YIN; XU, L.; PORTER, 2011). A SOD representa uma classe de enzimas oxirredutases que apresentam a função principal de neutralizar os radicais O_2^- citosólicos. Esses radicais são considerados um dos radicais livres mais críticos gerados no organismo, devido a sua capacidade de gerar outras espécies reativas como o radical hidroxila (CARILLON et al., 2013; MUSCOLI et al., 2003). Três diferentes isoformas dessa enzima foram caracterizadas em mamíferos: a SOD1, localizada no citoplasma, compartimentos nucleares e no espaço intermembranoso da mitocôndria; a SOD2 é encontrada na matriz mitocondrial; e a SOD3 encontrada em compartimentos extracelulares, com a peculiar característica de apresentar alta afinidade de ligação à matriz extracelular. Após essas enzimas realizarem a importante função de catalisar a dismutação do radical O_2^- , moléculas de O_2 e H_2O_2 são geradas (CARILLON et al., 2013; HOLLEY et al., 2012).

Como o H_2O_2 é tóxico para as células, outros sistemas antioxidantes, como a CAT, entram em ação para neutralizar essas espécies reativas. A CAT é uma enzima composta por 4 subunidades de 64 kDa amplamente conhecida

por metabolizar o H_2O_2 (GLORIEUX; CALDERON, 2017). Durante a reação enzimática que leva à destruição de H_2O_2 , a catalase é primeiro oxidada a um intermediário de ferro hipervalente, que é então reduzido de volta ao estado de repouso por uma segunda molécula de H_2O_2 . Essa reação enzimática, resulta na produção de duas moléculas de H_2O e uma de O_2 . Diferentemente da SOD, a CAT está localizada majoritariamente nos peroxissomos, por apresentar uma sequência sinal reconhecida por alguns receptores desses compartimentos celulares. Vale ressaltar que além de sua atividade catalítica, a CAT também pode atuar degradando pequenos substratos, como metanol, hidroperóxidos, azida e outros (GLORIEUX; CALDERON, 2017).

A GSH é um antioxidante de caráter hidrossolúvel, que apresenta um grupamento sulfidríla responsável por seu forte caráter doador de elétrons, participando de um grande número de reações redox. No ambiente celular, após a realizar a doação de elétrons, a glutatona se torna oxidada (GSSG), e a partir da enzima glutatona redutase é reciclada novamente em GSH, utilizando NADPH (do inglês – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) como cofator. Assim, a razão entre as formas reduzida e oxidada (GSH/GSSG) da glutatona é utilizada como um indicador do status redox da célula. Em condições não patológicas a fração reduzida da glutatona está em maior concentração e, juntamente com as outras defesas antioxidantes da célula, são capazes de neutralizar os radicais livres (BURTON et al., 2011; PICONI et al., 2003; SIES, 2001, 2015; VINCENT et al., 2004).

Entretanto, está amplamente aceito na literatura que o diabetes promove aumento da produção sistêmica de ROS e/ou RNS, assim como a diminuição da capacidade antioxidante do organismo como um todo, propiciando assim um ambiente favorável ao dano tecidual e consequentemente ao desenvolvimento de complicações e comorbidades diabéticas (BAYNES; THORPE, 1999; PENNATHUR; HEINECKE, 2004; PICONI et al., 2003). Mas, esse dano não ocorre uniformemente no organismo. Células endoteliais vasculares, por exemplo, falham em diminuir a captação de glucose durante estados hiperglicêmicos, o que resulta em altas concentrações intracelulares desse açúcar e, consequentemente, em danos via aumento do estresse oxidativo. Por isso é amplamente discutido na literatura a forte

correlação entre a hiperglicemia e as complicações microvasculares do diabetes (para revisão veja GIACCO; BROWNEE, 2010).

Importante para o presente estudo, sabe-se que dentre as diferentes linhagens celulares, os neurônios são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido a vários aspectos, como a incapacidade de regular negativamente a captação de glucose, e ao grande número de mitocôndrias (responsáveis pelo aumento da geração de ROS/RNS) (COBLEY et al., 2018; WANG et al., 2010). Outro aspecto importante é que de forma geral os neurônios apresentam uma defesa antioxidante mais modesta em relação a outros tecidos, o que os tornam mais sensíveis ao estresse oxidativo. Níveis citosólicos de GSH, por exemplo, são aproximadamente 50% menor em neurônios, quando comparados aos hepatócitos (COBLEY et al., 2018; RAJCHGOT et al., 2019).

O aumento do estresse oxidativo no paciente diabético como um todo, também pode causar reações autoimunes que prejudicam o funcionamento das células β -pancreáticas. Em consequência, podem ocorrer falhas na secreção e ação da insulina, o que promove uma exacerbação da condição diabética e consequentemente de suas complicações associadas (para revisão veja IGHODARO, 2018).

1.9 BIXINA

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$; BIX; Figura 1) é um diapocarotenoide lipossolúvel, considerada o principal pigmento das sementes de *Bixa orellana* L., uma árvore nativa do Brasil conhecida popularmente como Urucum. Com coloração avermelhado-alaranjada, esse carotenoide é o responsável por conferir a tonalidade característica das sementes do Urucum, sendo atualmente considerado o segundo corante natural mais utilizado do mundo (REHBEIN et al., 2007). Essa molécula apresenta grande destaque entre os carotenoides naturais, especialmente por apresentar a conformação cis, considerada incomum, e pela presença de um grupo carboxílico e éster metílico em sua estrutura química, os quais conferem alta lipossolubilidade à molécula (VILAR et al., 2014; SILVA et al., 2001). Essa característica possibilita que a BIX seja utilizada em uma ampla gama de produtos, desde geleias e refrigerantes a

COC(=O)/C=C/C(C)=C/C=C/C(C)=C/C=C/C(C)=C/C=C/C(C)=C/C=C/C

Com relação ao potencial farmacológico da BIX, estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram seu potente efeito antioxidante (TAY-AGBOZO et al., 2018), antitumoral (DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2019; REDDY et al., 2005; SANTOS, et al., 2016), anti-inflamatório (ROEHRS et al., 2017; TAO et al., 2016), antinociceptivo em modelos de dor aguda (PACHECO et al., 2019), e hipoglicemiante, a partir de sua ação agonista sobre receptores PPARs (GOTO et al., 2012; PINZÓN-GARCÍA et al., 2018; TAKAHASHI et al., 2009). Atualmente esse carotenoide é considerado ainda um neutralizador biológico de oxigênio reativo, com relevante efeito protetor sobre células e tecidos (SANTOS, et al., 2016; TAO et al., 2016; ZHANG et al., 2018) e com alto perfil de segurança, por não produzir alterações clínicas, histológicas ou necroscópicas em ratos machos e fêmeas, submetidos a tratamento subcrônico de 13 semanas (BAUTISTA et al., 2004).

Mesmo apresentando atividade hipoglicemiante, são escassos os estudos que avaliam a atividade da BIX sobre modelos animais diabéticos. Recentemente, Roehrs et al. (2014) e Assis et al. (2017) demonstraram que o tratamento com a BIX promove diminuição dos níveis plasmáticos de glucose em proporção similar a metformina, melhora do perfil lipídico e acentuada atividade antioxidante, em modelo animal de DM1. Além disso, Xu e Kong (2017) utilizando modelos animais de DM2, demonstraram que o tratamento com a BIX durante 14 semanas foi capaz de melhorar a resistência à insulina e

dislipidemia, protegendo os animais contra injúrias cardíacas induzidas pela dieta com alto teor de gordura. Os autores demonstraram ainda que o tratamento com a molécula foi eficaz em bloquear a via de sinalização do NF- κ B, além de diminuir significativamente a geração de ROS, por meio da ativação da via de sinalização do NRF2.

Outra característica importante da bixina é seu alto perfil de segurança, não produzindo alterações clínicas, histológicas ou necroscópicas em ratos, machos e fêmeas, submetidos a tratamento subcrônico de 13 semanas (BAUTISTA et al., 2004b). Além disso, a bixina exerce um efeito protetor contra agentes carcinogênicos e mutagênicos, sobre células e tecidos, efeito este intimamente associado ao potencial indutor da molécula sobre algumas enzimas metabolizadoras, como a CYP1A1/2 e CYP1B1/2, as quais desencadeiam a rápida inativação desses compostos (MATUO et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

Dessa forma, considerando que o estresse oxidativo está amplamente associado com a patogênese das complicações e comorbidades diabéticas, e dado o amplo potencial farmacológico da BIX, o presente estudo visou investigar o potencial efeito desse carotenoide sobre a dor neuropática, depressão e ansiedade associadas ao diabetes, bem como identificar alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial efeito da bixina sobre a alodinia mecânica, comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ), e avaliar possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar alterações no limiar mecânico de animais diabéticos tratados de maneira aguda ou repetida com bixina, veículo, ou insulina;
- Investigar alterações no comportamento tipo-ansioso de animais diabéticos tratados com bixina, veículo ou insulina;
- Investigar alterações na atividade locomotora de animais diabéticos tratados com bixina, veículo ou insulina;
- Investigar alterações no comportamento tipo-depressivo de animais diabéticos tratados com bixina, veículo, ou insulina;
- Avaliar o conteúdo de HbA1 em amostras de sangue total de ratos diabéticos tratados com bixina, veículo ou insulina;
- Avaliar o conteúdo de GSH, CAT, SOD e produtos da peroxidação lipídica (LPO) em amostras de hipocampo, córtex pré-frontal, nervo ciático e cordão espinhal lombar de ratos diabéticos tratados com bixina, veículo ou insulina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

As sementes de *Bixa orellana* L. foram coletadas na fazenda experimental do IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná), Rodovia Miguel Buffara, km 8, Morretes, Paraná, Brasil. Caixa Postal nº 11 - 83350 000 Fone/Fax: 55 (41) 3462-1203, Estação Experimental de Morretes EST.: Morretes / CÓD.: 02548038 / LAT.: 25º30'S/ LONG.: 48º49'W / ALT.: 59m, nos meses de junho e julho de 2012, julho de 2014 e agosto de 2017.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo biólogo e curador Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal de Curitiba, onde está depositada a exsicata sob o nº 379.394, autorização IBAMA nº 02001.001165/2013-47. A extração da bixina isolada foi realizada no setor de Ciências Farmacêuticas, campus III Jardim Botânico, Universidade Federal do Paraná por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.2 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais conduzidos no presente estudo utilizaram ratos machos da variedade Wistar (*Ratus norvegicus*, pesando de 180 a 220 g), provenientes no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro (12h / 12h) controlados, com livre acesso à ração padrão e água potável. Animais diabéticos foram alojados em número reduzido por caixa (número máximo de quatro por caixa), com maravalha trocada diariamente. Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos no ciclo claro (das 7:00 às 19:00 h), de acordo com as normas e legislações estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob aprovação do CEUA/BIO – UFPR protocolo #1294.

3.3 DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas: estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Califórnia, EUA), citrato de sódio (Merck S. A., Indústria Farmacêutica Brasil), bixina (BIX) com pureza estimada $\geq 99\%$ (GOLIN *et al.*, 2013) gentilmente fornecida pela Dr^a Samanta D. G. Pacheco, óleo de milho (Liza®, Brasil) utilizado como veículo (VEI), e INS humana NPH (Novolin®, Novo Nordisk, Brasil).

3.4 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

O diabetes foi induzido através de uma injeção única via intraperitoneal (i.p.), de STZ (60 mg/kg) diluída em tampão citrato (10mM, pH 4,5), em ratos submetidos a jejum prévio de 12 horas. Ratos normoglicêmicos receberam apenas o tampão citrato, em volume equivalente (i.p.). Três dias após, a condição hiperglicêmica foi confirmada utilizando amostras de sangue da veia caudal de aproximadamente 5 μ L, adicionadas a fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check ActiveTM, Roche) e analisadas através do glicosímetro digital (Accu-Check ActiveTM, Roche). Somente animais que apresentaram e mantiveram glicemia igual ou superior a 250 mg/dl até o fim dos experimentos, foram incluídos no grupo diabético e mantidos no estudo. Ratos normoglicêmicos foram usados como grupo controle. A massa corporal foi determinada antes da indução do diabetes e semanalmente durante o período experimental.

3.5 TRATAMENTO

Após a confirmação do estado diabético, os animais foram divididos em seis grupos experimentais: normoglicêmicos tratados com veículo (NGL + VEI), diabéticos tratados com veículo (DBT + VEI), diabéticos tratados com bixina (DBT + BIX; 3 doses) e diabéticos tratados com insulina (DBT + INS). Os tratamentos foram iniciados na 2^a semana após a indução do diabetes experimental. O VEI (0,5 ml/kg/dia; óleo de milho) e a BIX (nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg/dia; (PACHECO *et al.*, 2019; ROEHRS *et al.*, 2017) foram

administrados por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, sendo meia dose às 8:00h e meia dose às 16:00h, totalizando assim uma dose diária de bixina de 10, 30 ou 90 mg/kg. Já a INS (6UI/dia) foi utilizada como controle positivo e administrada por via subcutânea (s.c.), também duas vezes ao dia nesses mesmos horários, sendo 2 UI pela manhã e 4 UI a tarde (MORAIS, DE *et al.*, 2014). Esse regime de tratamento foi adotado, pois diversos estudos demonstram que 2 administrações diárias de uma droga hipoglicemiante, conferem melhor controle glicêmico do que uma administração única (GAMBETA; SOUZA, De MORAIS, 2015; MORAIS, DE *et al.*, 2014)

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Von Frey Eletrônico

A resposta ao estímulo mecânico foi avaliada por meio do teste do Von Frey eletrônico, mensurado a partir de um analgesímetro digital (INSIGHT Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O aparelho possui um transdutor conectado a um contador digital que registra o limiar aplicado na pata do animal em gramas. O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro, adaptada ao transdutor. Os animais são colocados em caixas de acrílico para ambientação por 15 min. Após a ambientação, uma força linearmente crescente no centro da região plantar das patas traseiras do animal é aplicada. O estímulo é cessado quando o animal produz uma resposta de retirada e/ou sacudida da pata estimulada. Três estimulações foram feitas em cada pata, e o limiar mecânico de cada animal foi obtido pela média dos valores das duas patas (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

3.6.2 Labirinto em Cruz Elevado

O comportamento tipo-ansioso dos animais foi avaliado através do teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Esse consiste em um aparato elevado 50 cm acima do chão, que contém 2 braços opostos abertos e 2 braços opostos fechados (45 x 15 cm), conectados por uma área central (15 x 15 cm). Os ratos

foram colocados na área central, voltados para um dos braços abertos, e seus movimentos foram gravados durante 5 minutos. Foi mensurado o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos braços abertos. Antes de cada teste o aparato foi higienizado com uma solução de álcool etílico 20% para evitar que o odor do animal anterior interferisse no comportamento do posterior (PELLOW et al., 1985).

3.6.3 Teste do Nado Forçado

O comportamento tipo-depressivo foi avaliado pelo teste do nado forçado (NF), descrito por Porsolt e colaboradores (1978), com modificações mínimas. O teste foi conduzido em duas sessões. Primeiro, na sessão pré-teste, os ratos foram colocados individualmente para nadar durante 15 minutos em um cilindro de PVC (20 cm de diâmetro x 50 cm de altura) contendo 30 cm de água à temperatura de aproximadamente 24° C. Vinte e quatro horas após, na sessão teste, os ratos foram novamente submetidos ao nado forçado, e durante 5 minutos, os comportamentos dos animais foram gravados. Nesses vídeos foram avaliados o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade, e a frequência de imobilidade total, com exceção de pequenos movimentos necessários para flutuar. Entre as sessões, a água do cilindro recém-utilizado foi escoada e uma nova água foi utilizada para evitar interferências no comportamento dos animais. Após cada sessão, os ratos foram submetidos à secagem com panos limpos e secos antes de retornarem para suas caixas.

3.6.4 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea foi avaliada no teste de campo aberto. O aparato do teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 50 x 63 cm, com o fundo dividido em nove quadrantes idênticos. Os ratos foram individualmente colocados no quadrante central do aparato, e os comportamentos dos animais foram gravados durante 5 minutos. Após o final dos experimentos, o número de cruzamentos realizados com as quatro patas

de cada animal foi avaliado. O número total de cruzamentos foi considerado como índice da atividade locomotora (SANTIAGO et al., 2010).

3.7 TESTES BIOQUÍMICOS

3.7.1 Preparação das Amostras

O córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIP), medula espinhal lombar (ME; L4-L6) e nervo ciático (NC; direito e esquerdo) de animais NGL e DBT foram coletados, homogeneizados em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0; 1:10 m/V) e centrifugados a 10.000 x g durante 20 minutos à temperatura de 4° C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos níveis de GSH e LPO. A atividade da CAT e SOD foi avaliada somente no sobrenadante da ME e do NC, devido a quantidade reduzida de amostra no CPF e HIP. A concentração de proteína total contida na amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976). A absorbância foi mensurada a 595 nm.

3.7.2 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Os níveis de LPO foram determinados a partir do ensaio de oxidação do íon ferroso/laranja de xilenol, descrito por Jiang e colaboradores (1992). Para isso, avaliou-se o conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) contidos na amostra, um produto altamente reativo resultante da peroxidação lipídica. Nesse ensaio, após a preparação descrita no item anterior, as amostras foram submetidas à centrifugação (10.000 x g), durante 5 minutos à 4 °C, após adição de metanol (1:2 v/v). Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram misturados a 900 µL de solução de reação (100 µM laranja de xilenol, 25 mM de H₂SO₄, 4 µM BHT, 250 µM de sulfato ferroso de amônia, e metanol 90%), e permaneceram em temperatura ambiente durante 30 minutos. A absorbância foi lida por meio de um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) à 570 nm e os resultados foram expressos como nmol de LOOH.mg de proteína⁻¹.

3.7.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação dos níveis de GSH foi realizada como descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Nesse ensaio, alíquotas de ácido tricloroacético (TCA; 50%) foram adicionadas a 200 μ L de amostra, e centrifugadas a 10.000 xg à 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi misturado ao tampão tris (400 mM Tris-base; pH 8,9) e DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoico ácido; 2.5 mM) em 25% de metanol. A absorbância foi lida por meio de leitor de placas (*Bio-Tek Ultra Microplate reader* EL808) à 415 nm, e a concentração de GSH foi calculada em comparação a curva padrão de GSH (230 μ L de tampão Tris-base 400 mM; 50 μ L TCA 10%). Os resultados foram expressos como μ mol GSH.mg proteína⁻¹.

3.7.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada com base na habilidade desta enzima em inibir a auto oxidação do pirogalol, descrita por Gao e colaboradores (1998). Nesse ensaio, alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao pirogalol (1 mM) e a solução tampão (composta por 200 mM de Tris HCl-EDTA (pH 8,0). Em seguida, essa solução foi homogeneizada, incubada durante 30 minutos, e finalizada com a adição de HCl. Após esse processo, foi realizada a centrifugação da solução durante 4 minutos, a 18.700 g. A absorbância foi lida por meio de leitor de placas (*Bio-Tek Ultra Microplate reader* EL808) à 440 nm. Baseado na informação de que a quantidade de SOD que inibe a reação em 50% é equivalente a 1 unidade (U) de SOD, os resultados foram expressos como U de SOD/mg de proteína.

3.7.5 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada como descrito por Aebi e colaboradores (1984). Nesse ensaio, 5 μ L do sobrenadante foram adicionados a 295 μ L de solução tampão, composta por 1M de Tris, 5mM de EDTA e 20 mM de H₂O₂ (pH 8,0), e homogeneizados. Em seguida, utilizando o espectrofotômetro SYNERGY HT, absorbância de 240 nm, foi avaliada a

diminuição da densidade óptica da solução, devido a decomposição do H_2O_2 , a cada 30 segundos, durante 5 minutos. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteína.

3.7.6 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada (HbA1) foi determinada em amostras de sangue total, coletadas ao final do experimento de ratos controle e diabéticos. Sua quantificação foi feita a partir do método de resina de troca iônica, de acordo com as instruções do fabricante (Human do Brasil, Itabira, Brasil). Nesse método, as amostras de sangue são misturadas a um reagente de lise, para formar um hemolisado. O preparado hemolisado é misturado a uma resina catiônica durante 5 minutos, a qual se associa fortemente a hemoglobina A0 e libera a hemoglobina A1 no sobrenadante. Após a centrifugação, a concentração de HbA1 foi determinada por meio de leitor de placas (*Bio-Tek Ultra Microplate reader* EL808) à 405 nm. O resultado foi expresso como %HbA1.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

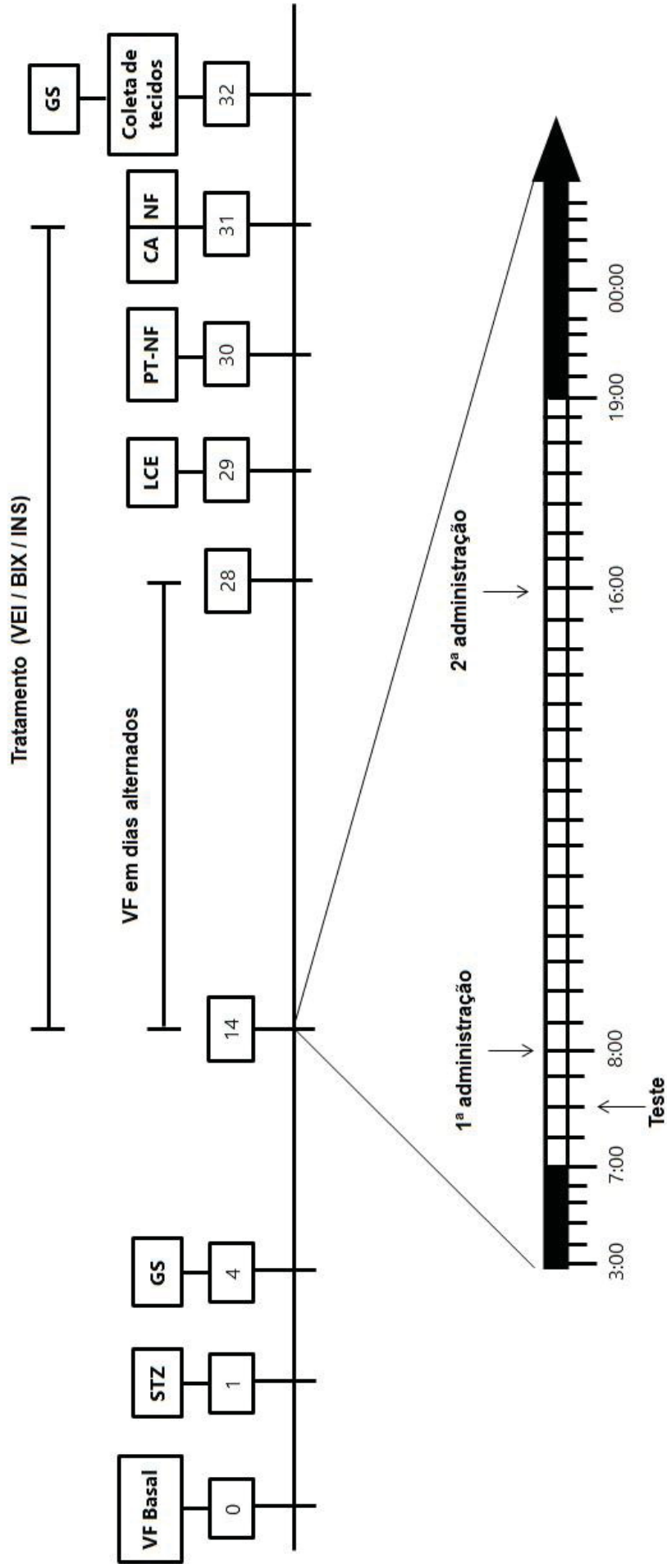
Os procedimentos experimentais conduzidos no presente estudo estão sumarizados na Figura 2. Os animais foram mantidos por pelo menos dois dias no biotério do laboratório para ambientação, antes da realização dos testes comportamentais, os quais foram conduzidos em salas com 40 lx de iluminação. O limiar mecânico foi avaliado antes da indução do diabetes (medida basal), a partir do teste do Von Frey eletrônico. Três dias após a injeção de estreptozotocina, a glucose sanguínea foi avaliada para confirmação do diabetes no grupo tratado com STZ. O limiar mecânico foi novamente avaliado 14 dias após a indução do diabetes (2ª semana), e então os animais diabéticos foram randomicamente divididos em 5 grupos experimentais e tratados com VEH (0,5 ml/kg; gavagem; óleo de milho); BIX (5, 15 ou 45 mg/kg; gavagem), ou INS (2 UI; s.c.). Ratos normoglicêmicos receberam veículo em volume equivalente (gavagem). O limiar mecânico foi mensurado 30, 60, 120 e 180 minutos após, para avaliação do efeito agudo dos tratamentos.

No período da tarde do 14º dia, animais diabéticos tratados com insulina (controle positivo) receberam a dose de 4 UI via subcutânea. Esse regime de tratamento foi adotado, já que estudos prévios indicam que o controle glicêmico adequado só é alcançado pelo tratamento com a insulina NPH, quando administrada nas doses de 2 UI pela manhã, e 4 UI a tarde (MORAIS, DE *et al.*, 2014). Para garantir a manipulação de todos os animais da mesma maneira, os grupos experimentais tratados com VEH (normoglicêmicos ou diabéticos) ou BIX (5, 15, ou 45 mg/kg), igualmente receberam as drogas no regime de duas administrações diárias. O tratamento foi mantido até o 31º dia após a STZ.

Durante esse período, os animais foram novamente submetidos ao teste do Von Frey eletrônico em dias alternados (medidas realizadas pela manhã, antes dos tratamentos, para excluir a possibilidade de efeitos adicionais causados pelo tratamento agudo), para avaliar o efeito cumulativo do tratamento sobre a alodinia mecânica, até o 28º dia após a indução do diabetes. No 29º, 30º e 31º dia após a STZ, novamente antes aos tratamentos diários, os grupos experimentais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado, pré-teste do nado forçado, e campo aberto seguido do teste do nado forçado, respectivamente. O peso corporal foi avaliado semanalmente, durante o decurso temporal do experimento.

Trinta e dois dias após a injeção de STZ e 15h após a última administração de BIX, INS ou VEH, os animais foram eutanasiados, submetidos à coleta das amostras biológicas, e tiveram a glicemia novamente mensurada para confirmação do estado diabético. Amostras de sangue total foram coletadas e armazenadas em tubos heparinizados para quantificação de HbA1c. O córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HIP), medula espinhal lombar (ME; L4-L6) e nervo ciático (NC; direito e esquerdo) foram dissecados, pesados e armazenados à -80 °C para posterior análises bioquímicas.

FIGURA 2 - DECURSO TEMPORAL DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS



Legenda: VF - Teste do von Frey eletrônico; STZ - Estreptozotocina; GS - Glucose sanguínea; VEI - Veículo (óleo de milho); BIX - Bixina; INS - Insulina; LCE - Teste do Labirinto em Cruz Elevado; PT-NF - Sessão Pré-teste do Nado Forçado; NF - Sessão Teste do Nado Forçado; CA - Teste do Campo Aberto. Números representam os dias após a injeção de STZ. O peso corporal foi mensurado semanalmente. FONTE: O autor.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para garantir que os dados atendiam os critérios para realização de testes paramétricos. Uma vez aceito, os dados foram apresentados como a média + erro padrão da média (EPM) de 6 a 10 animais por grupo experimental, e foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas. Quando apropriado, a análise de *post-hoc* de Newman-Keuls para comparações múltiplas foi aplicada. Tratamento e/ou tempo foram os fatores independentes utilizados. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0,05$. Todos os testes foram conduzidos utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 7 (San Diego, Califórnia).

4. RESULTADOS

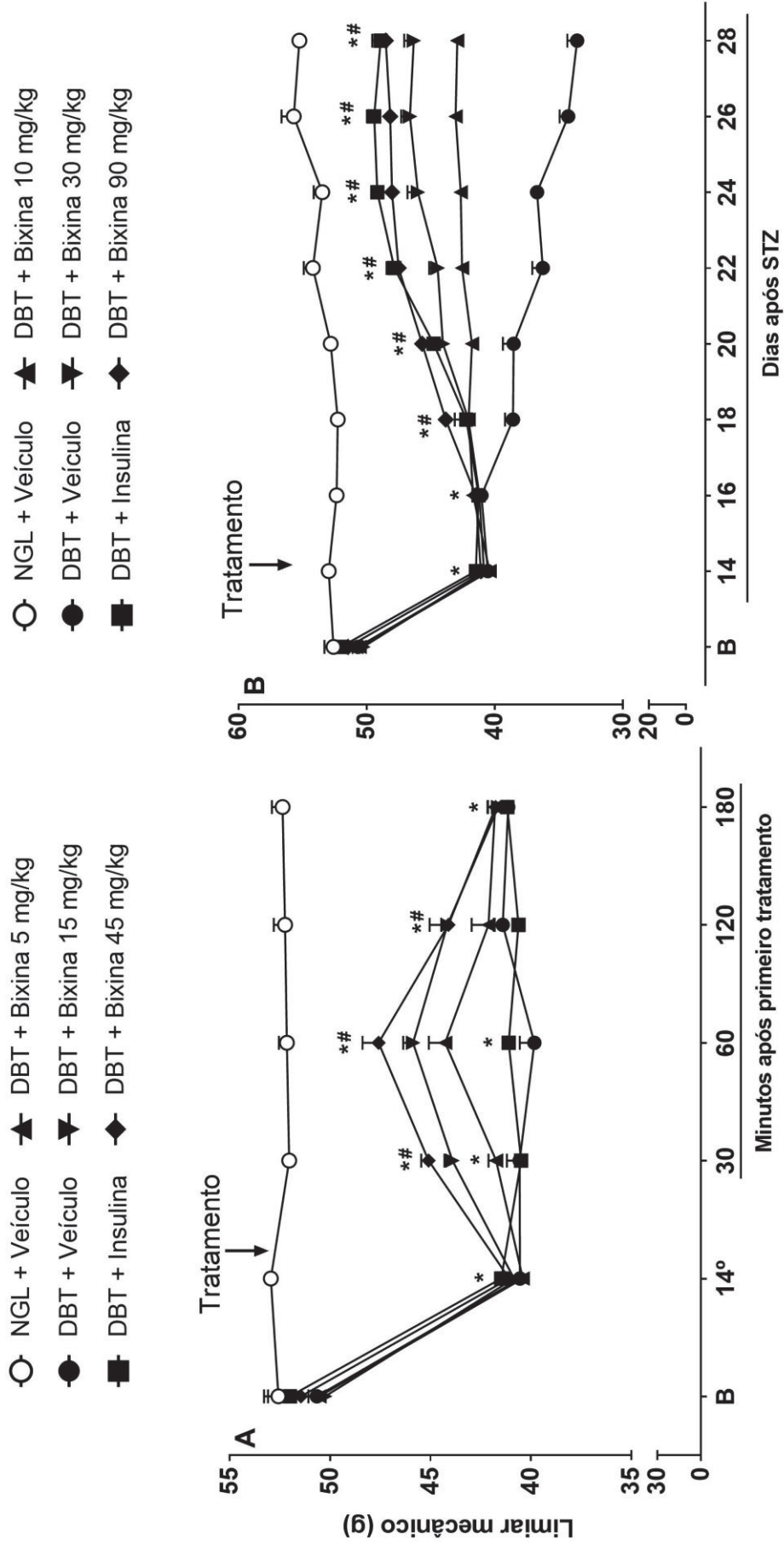
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM BIX OU INS SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA EM RATOS DIABÉTICOS

Como demonstrado na Figura 3 (Painel A), todos os animais diabéticos demonstraram redução do limiar mecânico 14 dias após a administração de STZ (grupos DBT), quando comparados ao grupo normoglicêmico (NGL + VEI), indicando o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significativos de tratamento [$F_{(5, 53)} = 212$; $p < 0,0001$], tempo [$F_{(5, 265)} = 132.6$; $p < 0,0001$] e também interação entre esses fatores [$F_{(25, 265)} = 8.35$; $p < 0,0001$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que os animais diabéticos tratados com uma única administração de BIX, nas doses de 15 ou 45 mg/kg, apresentaram significativo aumento do limiar mecânico após 30 minutos do primeiro tratamento, que perdurou até 2 horas após, em comparação ao grupo diabético controle (DBT + VEI). Já o tratamento com a BIX na menor dose (5 mg/kg) promoveu aumento do limiar mecânico somente 1 hora após o tratamento, em comparação ao grupo DBT + VEI ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos animais diabéticos tratados com INS (DBT + INS), durante o decurso temporal do experimento.

No painel B é possível observar o efeito do tratamento cumulativo com BIX ou INS sobre o limiar mecânico dos animais diabéticos até o 28º dia após a administração de STZ, considerado o pico da hiperalgesia mecânica. ANOVA de duas vias com medidas repetidas demonstrou efeitos significativos de tratamento [$F_{(5, 53)} = 186.3$; $p < 0,0001$], tempo [$F_{(5, 424)} = 125$; $p < 0,0001$] e também interação entre esses fatores [$F_{(40, 424)} = 22.63$; $p < 0,0001$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que quatro dias após o início do tratamento (18º dia), os animais diabéticos tratados duas vezes ao dia com INS (6 UI/dia) ou BIX (todas as doses) já apresentaram aumento significativo do limiar mecânico, quando comparados ao grupo DBT + VEI. Esse efeito permaneceu até o 28º dia após a administração de STZ ($p < 0,05$). O grupo controle NGL não demonstrou diferenças significativas no limiar mecânico durante o experimento.

FIGURA 3 - EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA DE ANIMAIS

DIABÉTICOS



Legenda: Avaliação do limiar mecânico basal (B), quatorze dias após administração de STZ (14°), e novamente 30, 60, 120 e 180 minutos após o primeiro tratamento com BIX (5, 15, ou 45 mg/kg) ou INS (2 UI) (Painel A). Efeito do tratamento repetido com BIX (10, 30 ou 90 mg/kg/dia) ou INS (6 UI/dia) sobre o limiar mecânico durante o decurso temporal do experimento (Painel B). Os dados representam a média +

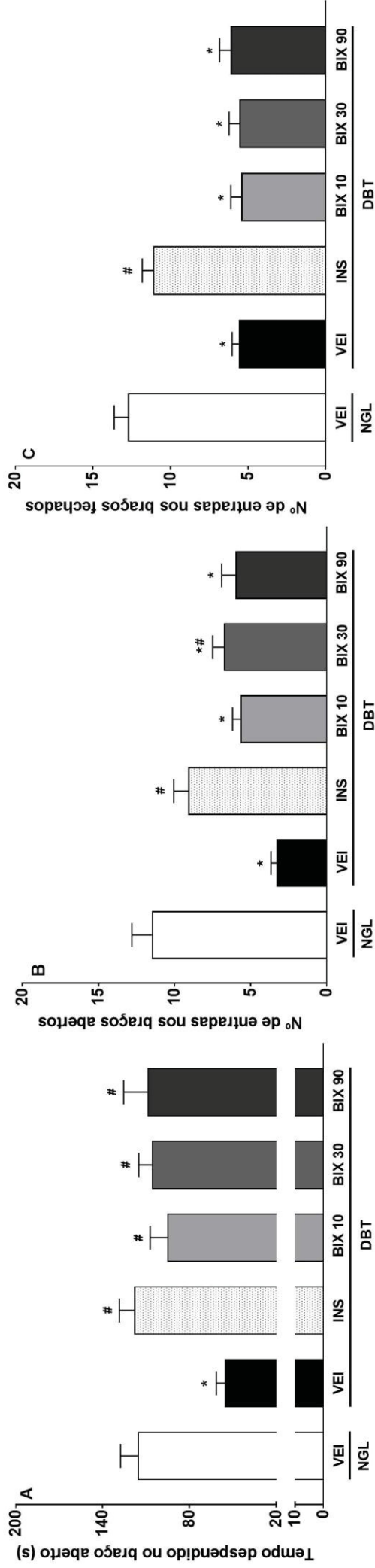
EPM (n= 8-10). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico controle tratado com veículo (NGL + VEI). # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle diabético tratado com veículo (DBT + VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de *post hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Quando comparados ao grupo controle normoglicêmico (NGL+VEI), o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou uma redução significativa no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, o que indica uma resposta do tipo ansiogênica. ANOVA de uma via demonstrou efeitos significativos do tratamento [$F_{(5, 46)} = 4.47$; $p < 0,05$]. O *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento repetido com BIX (todas as doses) ou INS (6 UI) foi capaz de induzir aumento significativo do tempo despendido nos braços abertos, sugerindo que essas drogas possuam um efeito do tipo ansiolítico ($p < 0,05$) (Figura 4; Painel A).

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre o número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE também é demonstrado na Figura 3 (Painel B e C, respectivamente). O grupo controle DBT demonstrou redução significativa do número de entradas nos braços abertos [$F_{(5, 46)} = 12.35$; $p < 0,0001$] e fechados [$F_{(5, 47)} = 22.73$; $p < 0,0001$], quando comparados ao grupo NGL. O *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o tratamento repetido com INS ou BIX, na dose de 30 mg/kg, foi efetivo em induzir aumento significativo no número de entradas dos braços abertos, quando comparados ao grupo DBT + VEI ($p < 0,05$). Entretanto, somente o tratamento repetido com INS foi capaz de induzir aumento significativo sobre o número de entradas nos braços fechados ($p < 0,05$).

FIGURA 4 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO DE ANIMAIS DIABÉTICOS



Legenda: Efeito do tratamento com BIX (10, 30 ou 90 mg/kg) ou INS (6 UI) sobre o tempo despendido nos braços abertos (Painel A), e o número de entradas nos braços abertos (Painel B) e fechados (Painel C) do teste do labirinto em cruz elevado. Valores foram expressos como a média + EPM de 8-10 animais por grupo experimental. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL) tratado com veículo (VEI). # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle diabético (DBT) tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

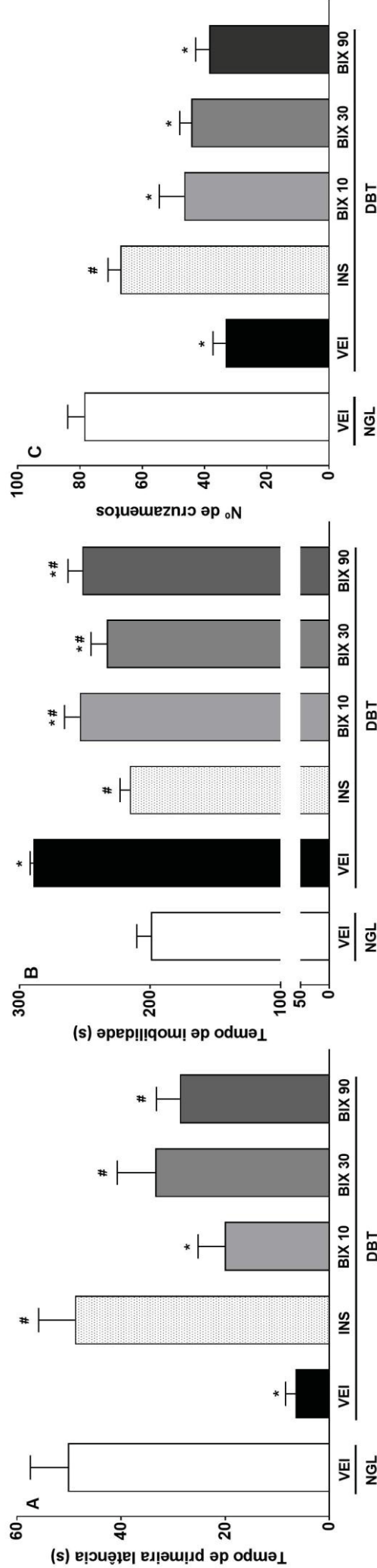
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DIABÉTICOS

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade no teste do nado forçado é demonstrado na figura 5, painel A. Quando comparado ao grupo normoglicêmico controle (NGL + VEI), o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou significativa diminuição no tempo de primeira latência, o que sugere um comportamento do tipo-depressivo. ANOVA de uma via mostrou efeito significativo de tratamento [$F_{(5, 41)} = 7.53$; $p < 0,0001$]. O teste de *post hoc* de Newman Keuls indicou que o tratamento repetido com INS ou BIX, nas doses de 30 e 90 mg/kg, foi capaz de induzir um aumento significativo do tempo de primeira latência, quando comparado ao grupo DBT + VEI ($p < 0,05$).

O grupo DBT + VEI também demonstrou significativo aumento no tempo de imobilidade total no teste do nado forçado, quando comparado ao grupo NGL, o que evidencia uma resposta do tipo-depressiva. ANOVA de uma via mostrou efeito significativo de tratamento [$F_{(5, 41)} = 9.831$; $p < 0,0001$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento repetido com INS ou BIX (todas as doses) diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais diabéticos, quando comparados ao grupo DBT + VEI ($p < 0,05$).

Para testar uma possível relação entre os efeitos da BIX observados e um déficit locomotor, animais normoglicêmicos tratados com VEI, e animais diabéticos tratados com BIX, INS ou VEI foram submetidos ao teste do campo aberto (Painel C). Quando comparado ao grupo NGL + VEI, o grupo controle DBT + VEI apresentou significativa diminuição no número de cruzamentos realizados durante o decurso temporal do teste. ANOVA de uma via com medidas repetidas evidenciou efeito significativo de tratamento [$F_{(5, 47)} = 11.76$; $p < 0,0001$]. *Post hoc* de Newman-Keuls indicou que somente o tratamento repetido com INS foi capaz de aumentar significativamente esse parâmetro ($p < 0,05$).

FIGURA 5 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DIABÉTICOS



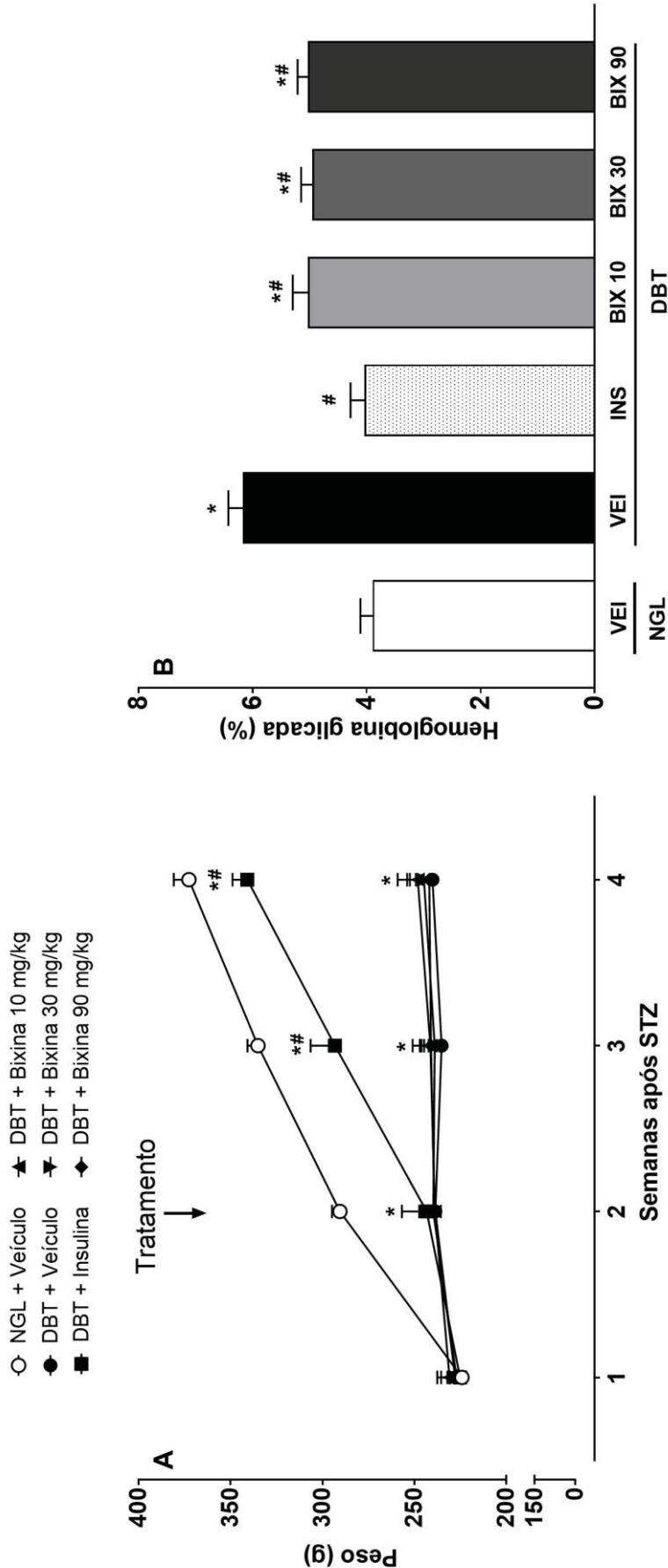
Legenda: Efeito do tratamento com BIX (10, 30 ou 90 mg/kg) ou INS (6 UI) sobre o tempo de primeira latência para o primeiro episódio de imobilidade (Painel A), e tempo de imobilidade total (Painel B) no teste do nado forçado. O Painel C demonstra o efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora de animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) no teste do campo aberto. Valores foram expressos como a média + EPM de 7-10 animais por grupo experimental. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI). # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle diabético tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIX OU INS SOBRE O PESO CORPORAL E PERCENTUAL DE HbA1 DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Quando comparados ao grupo controle normoglicêmico (NGL + VEI), os animais diabéticos (grupos DBT) exibiram uma diminuição significativa no ganho de peso corporal, como observado na Figura 6 (Painel A). ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelaram efeitos significativos de tratamento [$F_{(5, 53)} = 14.3$; $p < 0,0001$], tempo [$F_{(5, 159)} = 157.7$; $p < 0,0001$] e também interação entre esses fatores [$F_{(15, 169)} = 36.09$; $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento repetido com INS (6 UI) induziu um aumento significativo no ganho de peso corporal, quando comparado ao grupo diabético controle (DBT + VEI), uma e duas semanas após o início do tratamento ($p < 0,05$). Nenhum efeito foi observado sobre esse parâmetro após o tratamento repetido com BIX, durante o decurso temporal do experimento ($p > 0,05$).

Para testar uma possível relação entre os efeitos da BIX observados com seu potencial hipoglicemiante, avaliou-se o percentual de HbA1 em animais NGL e animais DBT tratados com BIX, INS ou VEI (Painel B). Como resultado, o grupo DBT + VEI apresentou uma porcentagem significativamente maior de HbA1 em comparação ao grupo controle NGL. ANOVA de uma via evidenciou efeitos significativos de tratamento [$F_{(5, 48)} = 13.19$; $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o tratamento repetido com INS ou BIX (todas as doses) promoveu redução significativa da porcentagem de HbA1, em comparação ao grupo controle DBT + VEI ($p < 0,05$).

FIGURA 6 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE O PESO CORPORAL E PERCENTUAL DE HEMOGLOBINA GLICADA EM ANIMAIS DIABÉTICOS



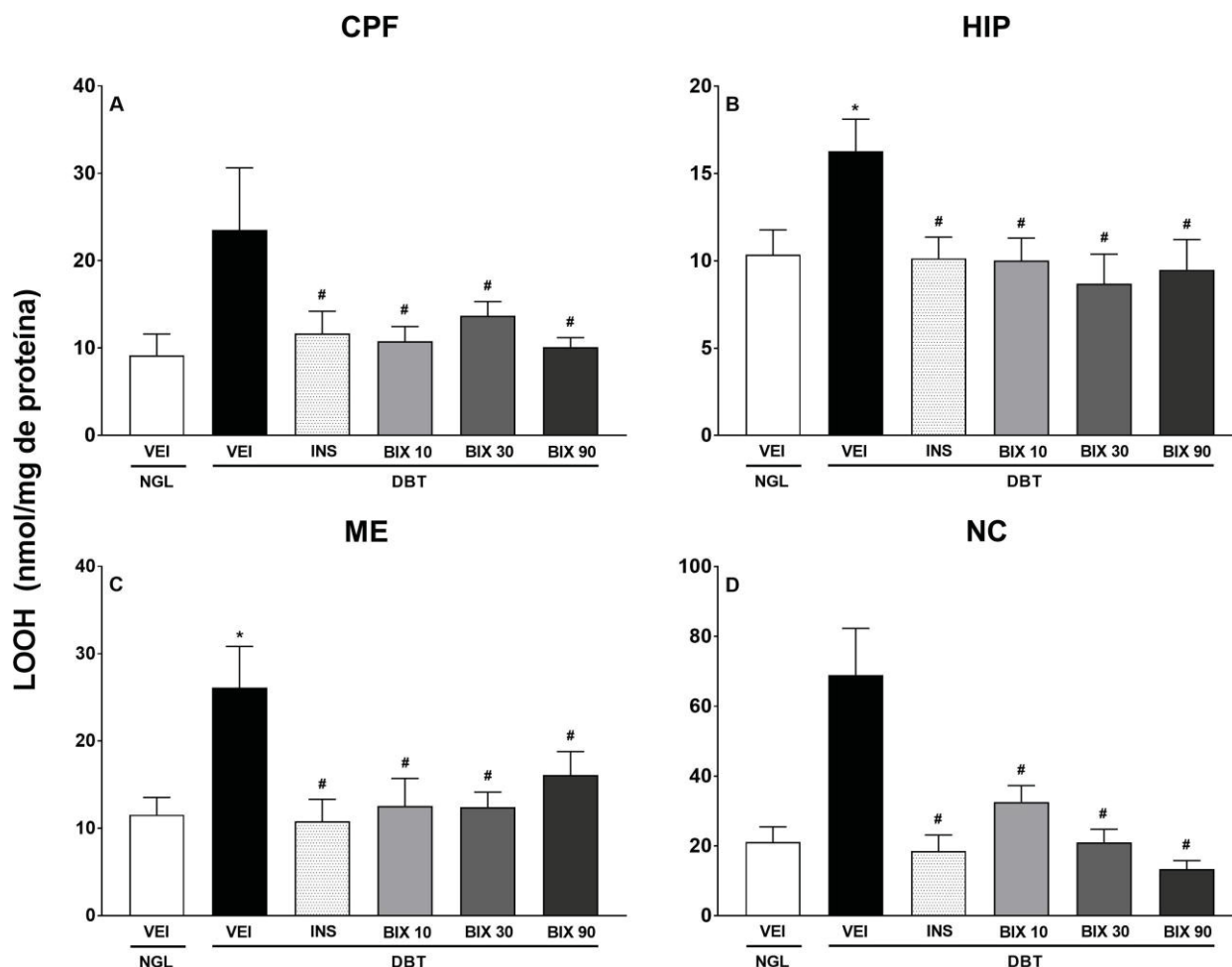
Legenda: Efeito do tratamento com bixina (BIX; 10, 30 ou 90 mg/kg) ou insulina (INS; 6 UI) sobre o peso corporal (Painel A) e percentual de HbA1c (Painel B) de animais diabéticos. Os dados representam a média + EPM (n = 9-10/grupo experimental). * indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL) tratado com veículo (VEI). # indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle diabético (DBT) tratado com VEI. ANOVA de uma (Painel A) ou duas (Painel B) vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.5 MEDIDAS INDIRETAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de LPO no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal lombar, e nervo ciático de animais diabéticos

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de LPO no CPF, HIP, ME, NC é demonstrado na Figura 7 (Painel A, B, C e D, respectivamente). ANOVA de uma via evidenciou efeitos significativos de tratamento no CPF [$F_{(5, 40)} = 2.651$; $p < 0,05$], HIP [$F_{(5, 41)} = 3.319$; $p < 0,05$], ME [$F_{(5, 48)} = 3.836$; $p < 0,05$] e também no NC [$F_{(5, 39)} = 9.21$; $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou significativo aumento nos níveis de LPO em todos os tecidos analisados, em comparação ao grupo controle normoglicêmico (NGL + VEI). Além disso, foi demonstrado que o tratamento repetido com BIX (todas as doses) ou INS foi efetivo em diminuir significativamente esse parâmetro em todos os tecidos, em comparação ao grupo DBT + VEH ($p < 0,05$).

FIGURA 7 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE OS NÍVEIS DE LPO EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

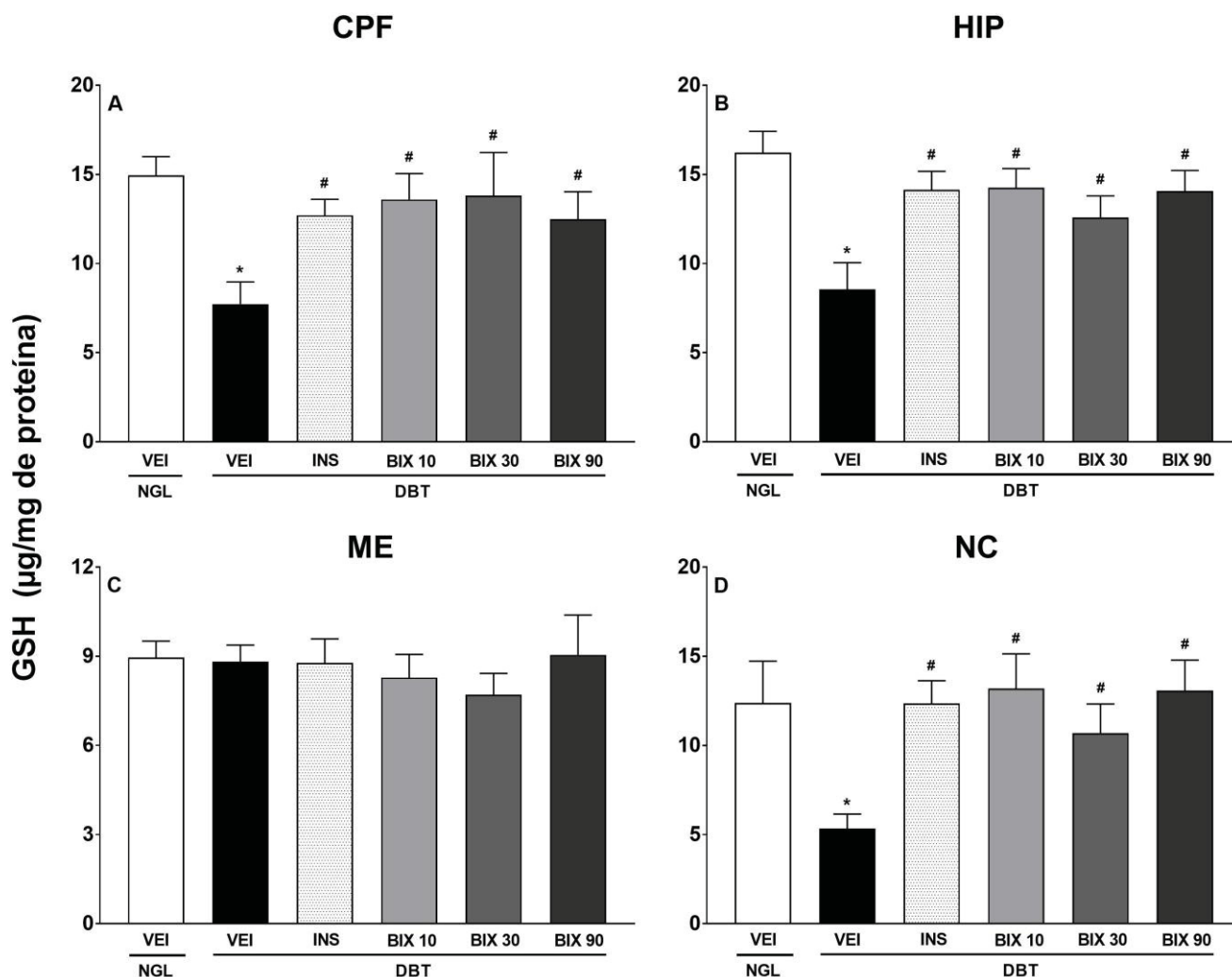


Legenda: Efeito do tratamento com bixina (BIX; 10, 30 ou 90 mg/kg) ou insulina (INS; 6 UI) sobre os níveis de LPO no córtex pré-frontal (CPF; Painel A), hipocampo (HIP; Painel B), medula espinhal lombar (ME; Painel C) e nervo ciático (NC; Painel D) de animais diabéticos. Os dados representam a média + EPM (n = 6-10). * indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI). # indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle diabético tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.5.2 Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal lombar, e nervo ciático de animais diabéticos

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre os níveis de GSH no CPF, HIP, ME, NC é demonstrado na Figura 8 (Painel A, B, C e D, respectivamente). ANOVA de uma via indicou efeitos significativos de tratamento no CPF [$F_{(5, 32)} = 3.499$; $p < 0,05$], HIP [$F_{(5, 38)} = 4.873$; $p < 0,05$] e NC [$F_{(5, 35)} = 3.83$; $p < 0,05$], mas não na ME [$F_{(5, 51)} = 0.3668$; $p > 0,05$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou diminuição significativa nos níveis de GSH no CPF, HIP e NC, em comparação ao grupo controle normoglicêmico (NGL + VEH). Além disso, foi demonstrado que o tratamento repetido com INS ou BIX (todas as doses) foi efetivo em restaurar os níveis de GSH nesses tecidos, quando comparado ao grupo DBT + VEH ($p < 0,05$).

FIGURA 8- EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE OS NÍVEIS DE GSH EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

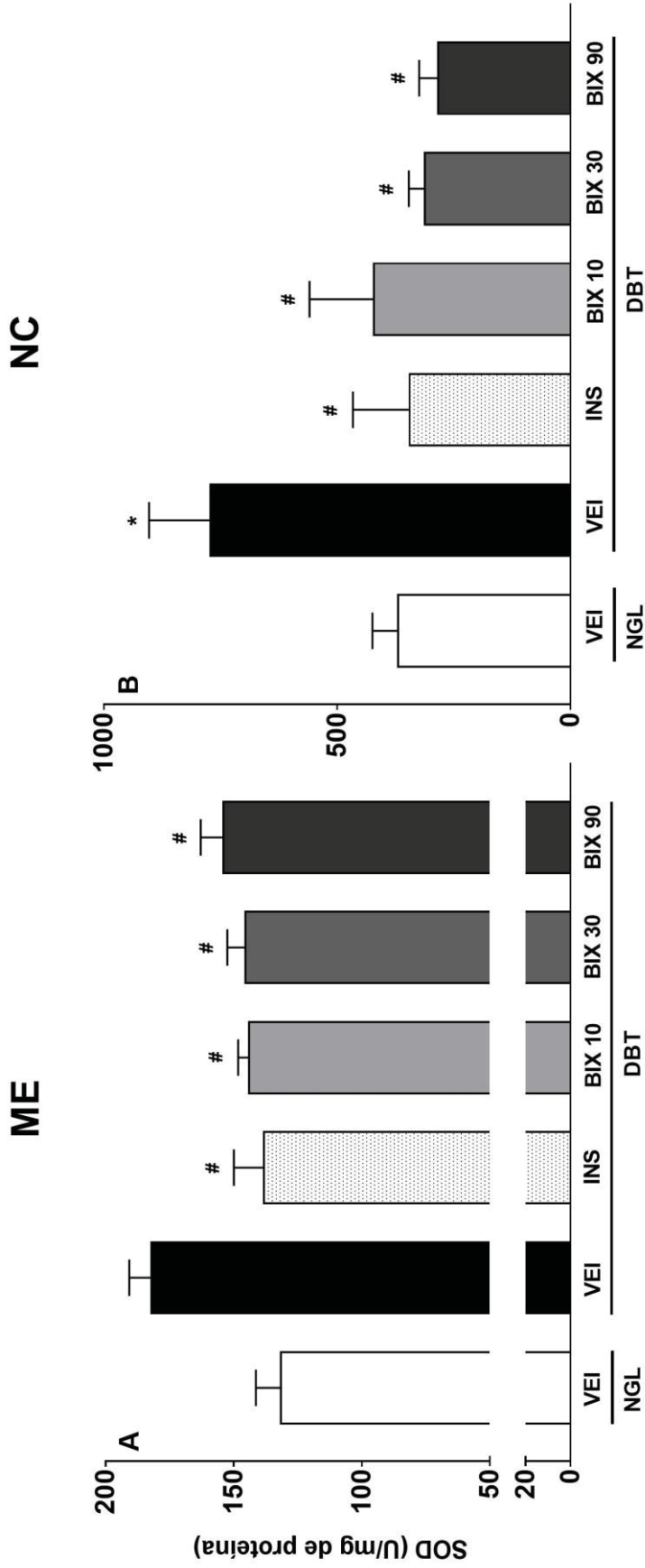


Legenda: Efeito do tratamento com bixina (BIX; 10, 30 ou 90 mg/kg) ou insulina (INS; 6 UI) sobre os níveis de GSH no córtex pré-frontal (CPF; Painel A), hipocampo (HIP; Painel B), medula espinhal lombar (ME; Painel C) e nervo ciático (NC; Painel D) de animais diabéticos. Os dados representam a média + EPM (n = 6-10). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI). # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle diabético tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.5.3 Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da SOD na medula espinal lombar e nervo ciático de animais diabéticos

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da SOD na ME e NC é demonstrado na Figura 9 (Painel A e B, respectivamente). ANOVA de uma via indicou efeitos significativos de tratamento na ME [$F_{(5, 28)} = 4.661$; $p < 0,05$] e NC [$F_{(5, 45)} = 4.034$; $p < 0,05$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou significativo aumento na atividade da SOD em ambos os tecidos, quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL + VEH) ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento repetido com INS ou BIX (em todas as doses) foi efetivo em diminuir significativamente esse parâmetro na ME e NC, quando comparado ao grupo DBT + VEH ($p < 0,05$).

FIGURA 9 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A ATIVIDADE DA SOD EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

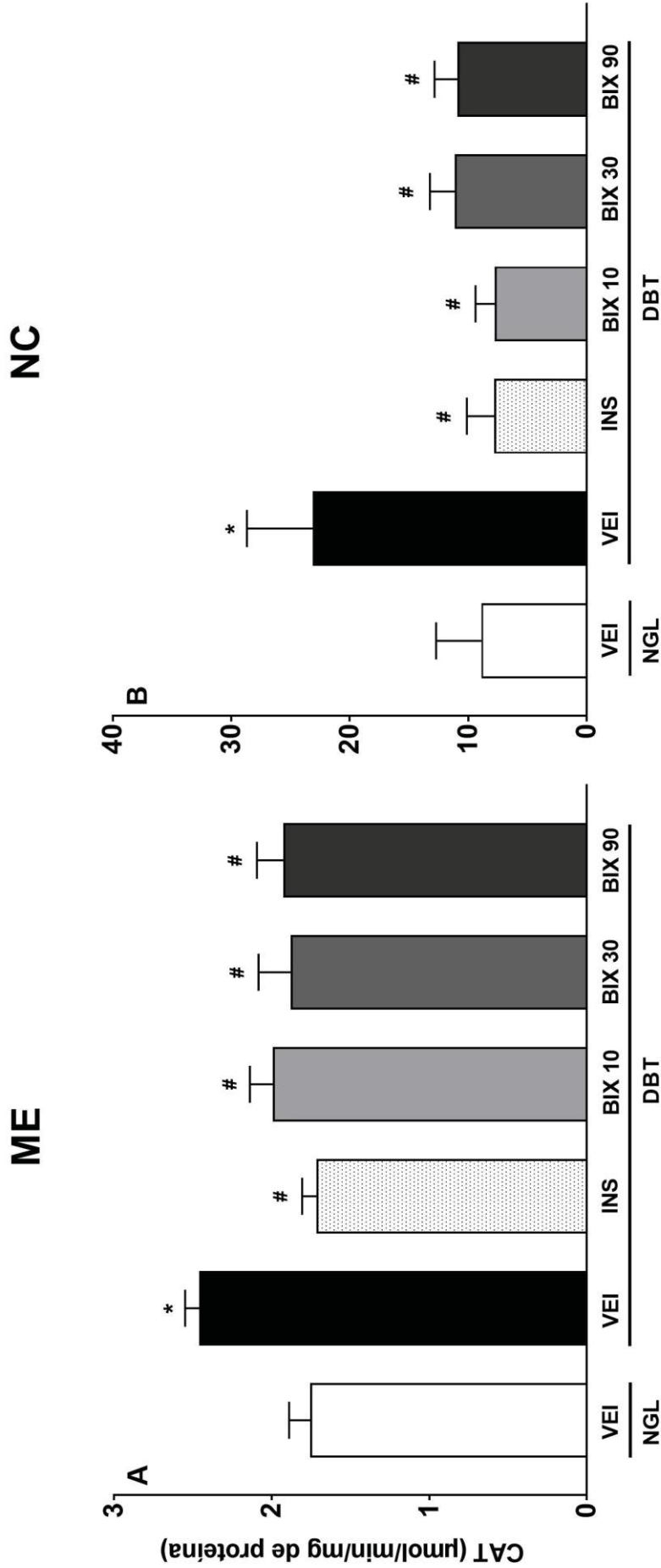


Legenda: Efeito do tratamento com bixina (BIX; 10, 30 ou 90 mg/kg) ou insulina (INS; 6 UI) sobre a atividade da SOD na medula espinal lombar (ME; Painel A) e nervo ciático (NC; Painel B) de animais diabéticos. Os dados representam a média + EPM (n = 5-6). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI). # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle diabético tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

4.5.4 Efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da CAT na medula espinhal lombar e nervo ciático de animais diabéticos

O efeito do tratamento repetido com BIX ou INS sobre a atividade da CAT na ME e NC é demonstrado na Figura 10 (Painel A e B, respectivamente). ANOVA de uma via indicou efeitos significativos de tratamento na ME [$F_{(5, 42)} = 3.219$; $p < 0,05$] e NC [$F_{(5, 46)} = 3.501$; $p < 0,05$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o grupo diabético controle (DBT + VEI) apresentou um significativo aumento na atividade da CAT em ambos os tecidos, quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL + VEH) ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento repetido com INS ou BIX (em todas as doses) foi efetivo em diminuir significativamente esse parâmetro na ME e NC, quando comparado ao grupo DBT + VEH ($p < 0,05$).

FIGURA 10 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM BIXINA OU INSULINA SOBRE A ATIVIDADE DA CAT EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DE ANIMAIS DIABÉTICOS



Legenda: Efeito do tratamento com bixina (BIX; 10, 30 ou 90 mg/kg) ou insulina (INS; 6 UI) sobre a atividade da CAT na medula espinhal lombar (ME; Painei A) e nervo ciático (NC; Painei B) de animais diabéticos. Os dados representam a média + EPM (n = 9-8). * indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI). # indica p < 0,05 quando comparado ao grupo controle diabético tratado com VEI. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman Keuls. FONTE: O autor.

5. DISCUSSÃO

As principais contribuições do presente trabalho foram as seguintes: 1) A BIX exerce importante efeito antihiperalgésico, quando administrado de forma aguda e repetitiva, em modelo de dor neuropática, em ratos com diabetes experimental induzido quimicamente por STZ; 2) o tratamento repetido com esse carotenoide exerce efeitos do tipo antidepressivo e ansiolítico sem promover prejuízo locomotor, sobre esse modelo animal; 4) esses efeitos comportamentais foram acompanhados de melhora do percentual de HbA1 e parâmetros indiretos de estresse oxidativo, em tecidos periféricos e centrais relacionados às complicações e comorbidades diabéticas, de interesse para o presente estudo. Ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a demonstrar tais efeitos. Dessa forma, considerando o perfil insatisfatório dos tratamentos farmacológicos disponíveis, a BIX pode representar uma alternativa terapêutica para o tratamento de complicações e comorbidades relacionadas ao diabetes, especialmente a dor neuropática, depressão e ansiedade.

A STZ é uma toxina, considerada a droga mais comumente utilizada para a indução do diabetes em animais. Isso ocorre devido a sua propriedade diabetogênica, caracterizada por promover a destruição seletiva das células β -pancreáticas. Como consequência, esse modelo animal exibe uma série de mudanças metabólicas que mimetizam o DM1, causando deficiência em insulina, hiperglicemia, poliúria, polidipsia, aumento do percentual de HbA1, e diminuição do ganho de peso (SZKUDELSKI, 2001; WU; HUAN, 2008). Além dessas mudanças metabólicas, de forma importante para o presente estudo, animais tratados com STZ desenvolvem hiperalgesia mecânica (JESUS et al., 2019; REDIVO et al., 2016), além de comportamentos do tipo-ansioso e depressivo (DE MORAIS et al., 2014; PEREIRA et al., 2018), todos relacionados às complicações e comorbidades associadas ao diabetes em humanos.

O controle da hiperglicemia é considerado o maior fator envolvido na gênese da neuropatia diabética (ALEY; LEVINE, 2001). Entretanto, como um rígido controle glicêmico nem sempre é clinicamente possível, e considerando as abordagens terapêuticas atualmente disponíveis como insatisfatórias para

uma parcela significativa dos pacientes (FELDMAN et al., 2017), drogas alternativas para o tratamento de casos refratários de dor crônica são extremamente importantes. Como previamente observado (JESUS et al., 2019; REDIVO et al., 2019), nossos resultados demonstraram que os animais DBT desenvolvem hiperalgesia mecânica a partir da segunda semana de indução do diabetes, apresentando um pico do comportamento nociceptivo na quarta semana após a administração de STZ (Figura 3).

Essa resposta nociceptiva foi significativamente atenuada pelo tratamento com a BIX, quando administrada de forma aguda no 14º dia, e também quando administrada repetidamente durante quatorze dias (todas as doses). O efeito antinociceptivo agudo da bixina, começando 30 minutos após o tratamento e persistindo até os 120 minutos, parece ser consistente com a farmacocinética da molécula, a qual apresenta um pico plasmático de uma a duas horas após administração sistêmica, em modelos animais (PARK et al., 2016, 2018) e humanos (LEVY et al., 1997). Além disso, em concordância com os resultados obtidos, um estudo prévio de nosso grupo já demonstrou o efeito antinociceptivo da BIX em modelos pré-clínicos de dor aguda, como no teste da formalina e do ácido acético (PACHECO et al., 2019). Entretanto, ao nosso conhecimento, a habilidade do tratamento com esse carotenoide em atenuar uma dor crônica, mais especificamente a hiperalgesia mecânica associada ao diabetes, é um achado sem precedentes na literatura.

O tratamento repetido com INS, utilizado como controle positivo, também promoveu redução significativa da hiperalgesia mecânica nos animais DBT, como extensivamente demonstrado na literatura (ALEY; LEVINE, 2001; CALCUTT et al., 1996; COURTEIX et al., 1996). Diversos autores sugerem que esse efeito ocorra devido ao fato de que o tratamento repetido com INS promove redução das lesões neuropáticas induzidas pela hiperglicemia, e ativação dos receptores de INS nos nervos periféricos. A partir disso, a INS é capaz de normalizar algumas mudanças axonais promovidas pela neuropatia diabética periférica, como desmielinização, atrofia axonal e deficiência na velocidade de condução do estímulo. Por essas e outras evidências, diversos autores indicam o importante papel neurotrófico exercido pela INS (BRUSSEE et al., 2004; GIBBONS, 2017; OZAKI et al., 2013; RACHANA et al., 2016, 2018). Entretanto, nenhum efeito foi observado sobre a hiperalgesia mecânica

após administração aguda desse hormônio. Estudos prévios indicam que as mudanças bioquímicas, morfológicas e funcionais sobre o SNC e SNP, induzidas pela condição diabética precisam de um tratamento contínuo para serem revertidas por uma droga hipoglicemiante (ALEY; LEVINE, 2001; COURTEIX et al., 1996).

Consequentemente, a propriedade hipoglicemiante da BIX provavelmente não seja o principal mecanismo pelo qual esse carotenoide exerce seu efeito antinociceptivo agudo, sobre a hiperalgesia mecânica desses animais. Considerando a rapidez do efeito farmacológico observado (30 minutos), acredita-se que esse carotenoide seja capaz de atuar sobre canais iônicos, alterando o potencial de membrana da fibra nociceptiva e, dessa forma, aumentando o limiar mecânico desse animal diabético (SCHREIBER *et al.*, 2015)

Considerando que 51,4% dos pacientes diagnosticados com DND apresentam comorbidades mentais associadas, e que a depressão e ansiedade coexistem em 26,4% dos casos (NARANJO et al., 2019), o próximo conjunto de experimentos teve como objetivo avaliar o efeito da BIX sobre os comportamentos tipo-ansioso e depressivo dos animais diabéticos. Esses foram conduzidos 28 dias após a administração de STZ, de acordo com estudos prévios que demonstraram a importância desse decurso temporal para a indução de mudanças significativas sobre as respostas comportamentais dos animais diabéticos (DE MORAIS et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; REDIVO et al., 2016).

O LCE é um teste amplamente utilizado para triagem de drogas com potencial ansiolítico. É baseado na tendência natural que roedores apresentam em evitar locais abertos e elevados, e na sua curiosidade inata de explorar áreas novas. Dessa forma, roedores mais ansiosos tendem a permanecer mais tempo nos braços fechados e realizar menor número de entradas em ambos os braços do labirinto (COSTA et al., 2014; KRAEUTER et al., 2019). Já o teste do NF é extensivamente utilizado para triagem de drogas com potencial antidepressivo. Baseia-se na observação de que ratos forçados a nadar em um espaço restrito, em determinado momento cessam as tentativas de escapar e permanecem imóveis, realizando apenas pequenos movimentos necessários para flutuar. Dessa forma roedores com comportamento do tipo-depressivo

apresentam menor tempo de tentativa de escape (tempo de primeira latência) e maior tempo de imobilidade (PORSOLT et al., 1978; YANKELEVITCH-YAHAV et al., 2015).

Nossos dados suportaram estudos prévios (GAMBETA et al., 2015; HO et al., 2012; DE MORAIS et al., 2014; PEREIRA et al., 2018) demonstrando que os animais DBT apresentam redução significativa do tempo despendido nos braços abertos e no número de entradas em ambos os braços do LCE, quando comparados ao grupo NGL (Figura 4). Além disso, quando avaliados no teste do NF, os animais DBT apresentaram menor tempo de primeira latência e aumento do tempo total de imobilidade, em relação ao grupo NGL (Figura 5; Painel A e B). Esses refletem os comportamentos característicos do tipo-ansioso e depressivo dos animais DBT. O tratamento repetido com BIX foi capaz de atenuar esses parâmetros, aumentando o tempo despendido (todas as doses) e número de entradas nos braços abertos (na dose de 30 mg/kg) do LCE, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. Além disso, o tratamento repetido com esse carotenoide foi efetivo em aumentar significativamente o tempo de primeira latência (nas doses de 30 e 90 mg/kg) e diminuir o tempo de imobilidade (todas as doses) no teste do NF, sugerindo um efeito do tipo antidepressivo.

Ao nosso conhecimento, essa é a primeira vez na literatura em que a habilidade da BIX em atenuar comportamentos do tipo-ansioso e depressivo foi demonstrada. Entretanto, alguns estudos suportam nossos resultados obtidos. Um artigo publicado recentemente (LAKEY-BEITIA et al., 2019) demonstrou o alto potencial terapêutico dos carotenoides, incluindo a BIX, sobre doenças neurodegenerativas. Os autores propuseram que a atividade neuroprotetora desse conjunto de compostos, de forma geral ocorra devido as suas propriedades antioxidantes e nutraceuticas, além da habilidade da maioria dos carotenoides em atravessar a barreira hematoencefálica. Suportando esses dados, a BIX apresenta grande destaque dentre os carotenoides naturais justamente devido a sua alta solubilidade lipídica e potencial antioxidante, sendo considerada um potente neutralizador biológico de oxigênio reativo. Além disso, como mencionado a seguir, diversos autores demonstram o importante papel do estresse oxidativo sobre diferentes áreas cerebrais, para o desenvolvimento de desordens psiquiátricas relacionadas ao diabetes, como a

depressão e ansiedade (ERGENC et al., 2019; FONTELLA et al., 2005; DE MORAIS et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

Os efeitos antinociceptivo, do tipo-ansiolítico e antidepressivo da BIX parecem ser um efeito específico do tratamento, já que não houve alteração da atividade locomotora desses animais em relação ao grupo controle DBT, quando submetidos ao teste do campo aberto (Figura 5; Painel C). Além disso, em acordo com os resultados obtidos, um estudo prévio de nosso grupo já demonstrou que o tratamento agudo com a bixina, nas doses de 15 e 30 mg/kg, não promove alteração da atividade locomotora de animais normoglicêmicos (PACHECO et al., 2019). Embora os animais DBT tenham apresentado diminuição da atividade locomotora, como previamente observado (HAIDER et al., 2013; REDIVO et al., 2016), somente o tratamento com INS foi capaz de restaurar esse parâmetro. Esses dados, aliados com a melhora da hiperalgesia mecânica e comportamento tipo-ansioso e depressivo, sugerem que o tratamento repetido com INS promova uma melhora geral da saúde dos animais diabéticos. Dessa forma, os efeitos benéficos da INS sobre o comportamento tipo-ansioso e depressivo (GAMBETA et al., 2015; DE MORAIS et al., 2014), cardiomiopatia diabética (DEROSA et al., 2019), ganho de peso, neuropatia diabética (COURTEIX et al., 1996) e outras complicações (BERTELSMANN et al., 1987), parecem ser dependentes da condição diabética.

Com relação ao peso corporal, animais DBT demonstraram uma significativa diminuição do ganho de peso durante o decurso temporal do experimento, em comparação ao grupo de animais NGL. Entretanto, somente o tratamento repetido com INS foi capaz de aumentar significativamente esse parâmetro, devido à melhora da condição diabética como um todo (Figura 6; Painel A). Poucos estudos estão disponíveis avaliando o efeito da BIX sobre o peso corporal. Um estudo prévio utilizando ratos com diabetes induzido por STZ, suportando nossos dados demonstrou a inabilidade do tratamento com esse carotenoide (5,5 mg/kg), durante 50 dias, em aumentar o ganho de peso desses animais (ASSIS et al., 2017). Outro trabalho, demonstrou que camundongos com DM2, tratados com BIX (40 mg/kg) durante 4 semanas, apresentaram diminuição do peso corporal e da chance de desenvolvimento de obesidade, devido a ação agonista desse carotenoide sobre os receptores

PPAR α (GOTO et al., 2012). Assim, o fato da BIX ajudar no emagrecimento de modelos animais de DM2, pode explicar a inabilidade da molécula em aumentar o ganho de peso no presente estudo.

Baseado nos resultados promissores da BIX obtidos a partir dos testes comportamentais, análises bioquímicas foram realizadas para explorar possíveis mecanismos de ação envolvidos com esses efeitos. Considerando que a hiperglicemia é reconhecida como tendo um efeito crucial sobre a patogênese e progressão das complicações e comorbidades diabéticas (IGHODARO, 2018), o efeito dos tratamentos sobre o percentual de HbA1c foi avaliado. Nossos dados suportaram estudos prévios (ABDEL-KADER et al., 2019; DE MORAIS et al., 2014), demonstrando que animais DBT apresentam aumento significativo do percentual de HbA1c, em comparação aos animais NGL (Figura 6, Painel B). Esse percentual foi significativamente reduzido pelo tratamento repetido (18 dias) com INS ou BIX, confirmando os efeitos hipoglicemiantes de ambas as drogas (PINZÓN-GARCÍA et al., 2018; ROEHRS et al., 2014; XU; KONG, 2017). Trabalhos anteriores demonstraram que a administração diária de BIX, durante 30 dias, promoveu melhora no controle glicêmico e bloqueou o aumento de frutossamina, colesterol LDL, e dos níveis de triglicerídeos, em ratos com diabetes induzido por STZ (ROEHRS et al., 2014). Takahashi et al. (2009) e Goto et al. (2012) atribuem esses efeitos benéficos da BIX a sua ação agonista sobre os receptores PPARs (α e γ), os quais dentre outros efeitos, promovem aprimoramento da captação de glucose dependente de insulina, além de melhora de desordens metabólicas induzidas pela obesidade, como demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro*.

Diversos autores demonstram que os mecanismos pelos quais a hiperglicemia a longo prazo leva às complicações diabéticas, são ativados pelo aumento do estresse oxidativo celular (para revisão veja GIACCO; BROWNLEE, 2010). Isso ocorre especialmente em nervos e neurônios devido ao seu alto conteúdo lipídico e pobre defesa antioxidante (IGHODARO, 2018). Considerando que a peroxidação lipídica de membranas e a depleção de GSH, são considerados os sinais mais relevantes do estresse oxidativo induzido pelo diabetes (VINCENT et al., 2004), nosso próximo conjunto de experimentos teve como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos sobre esses parâmetros no CPF e HIP, consideradas áreas cerebrais relacionadas à ansiedade e depressão

(PEREIRA et al., 2018; REBAL et al., 2017), e também na ME e NC, por serem tecidos amplamente relacionados com a DND (HASSLER et al., 2014; IMPELLIZZERI et al., 2019). Além disso, devido a quantidade de amostra, nós avaliamos somente na ME e no NC, a atividade da SOD e da CAT, duas enzimas antioxidantes amplamente envolvidas com na cascata do estresse oxidativo.

Nossos dados mostraram que os animais diabéticos apresentaram aumento do estresse oxidativo no CPF, HIP, ME e NC, como evidenciado pelas alterações dos parâmetros indiretos do estresse oxidativo (Fig. 7, 8, 9 e 10). Com relação a ME, o estresse oxidativo foi evidenciado pelo aumento de LPO, SOD e CAT mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DBT e NGL em relação aos níveis de GSH. Isso pode ser explicado devido ao decurso temporal do experimento (32 dias), considerando que outros estudos já demonstraram a diminuição dos níveis de GSH na ME, 8-16 semanas após administração de STZ (IMPELLIZZERI et al., 2019; MARITIM et al., 2003).

Suportando nossos dados, sabe-se que além das características citadas acima, os neurônios são considerados particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido a aspectos como a inabilidade em regular negativamente a captação de glucose durante estados hiperglicêmicos; ao grande número de mitocôndrias responsáveis pelo aumento da produção de ROS/RNS; e aos longos axônios, o que justifica o fato de nervos dos membros inferiores estarem mais suscetíveis ao dano durante a DND, por exemplo (COBLEY et al., 2018; WANG et al., 2010). Outro aspecto importante é que essas espécies reativas promovem aumento significativo do dano ao DNA, proteínas, e membranas especialmente em nervos periféricos e na raiz dorsal da medula espinhal. Essas mudanças levam a apoptose das células de Schwann e dano nervoso, ambos considerados aspectos importantes para o desenvolvimento da dor neuropática (CUNHA et al., 2008; HASSLER et al., 2014; IMPELLIZZERI et al., 2019).

Mas dentre todos os órgãos, o cérebro é considerado particularmente suscetível ao dano promovido pelo estresse oxidativo devido à alta demanda de oxigênio, a abundância de metais ativos-redox, e os altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados passíveis de oxidação. Embora alguns neurônios

cerebrais possam tolerar o aumento do estresse oxidativo de forma mais satisfatória, sabe-se ainda que, de interesse para o presente estudo, algumas regiões cerebrais são particularmente vulneráveis ao dano por apresentarem sensibilidades diferentes aos agentes estressores. Neurônios do HIP e CPF, por exemplo, são regiões mais propensas ao dano tecidual e neurodegeneração. Estudos transcriptômicos indicam que isso ocorre porque esses neurônios apresentam maior expressão de genes que levam ao aumento da produção de ROS no estado endógeno, em comparação às populações de neurônios mais resistentes. Somado a isso, o aumento do EO promovido pela condição diabética induz modificações de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, levando a mudanças que culminam em disfunções e perda de atividade. Além disso, suportando nossos dados, diferentes autores sugerem que altas concentrações de ROS/RNS alteram a transmissão sináptica entre os neurônios, uma das teorias mais conhecidas para o desenvolvimento de transtornos mentais (COBLEY et al., 2018; MARITIM et al., 2003; RAJCHGOT et al., 2019; WANG et al., 2010).

Considerando que a hiperglicemia é o maior contribuinte para o estresse oxidativo em pacientes diabéticos, como esperado a INS foi capaz de reestabelecer todos os parâmetros do estresse oxidativo nos tecidos centrais e periféricos analisados. Suportando esse resultado, diversos estudos demonstram que além dos efeitos sobre o controle glicêmico, o tratamento repetido com INS também apresenta um importante papel eliminando espécies reativas, em modelos animais de diabetes (GUPTA et al., 2014; DE MORAIS et al., 2014; WAYHS et al., 2010). Além disso, sabe-se que a INS apresenta um importante efeito protetor sobre o SNC modulando a função mitocondrial, a síntese de colesterol cerebral, o sistema serotoninérgico, o transporte de GABA e glutamato, e melhorando a plasticidade sináptica (GUPTA et al., 2014; HUANG et al., 2010; KLEINRIDDERS et al., 2014; SESTILE et al., 2016). Assim, evidências indicam que não somente a hiperglicemia, mas também a falta de insulina pode estar envolvida no aumento do estresse oxidativo e no desenvolvimento da depressão e ansiedade associadas ao diabetes (DE MORAIS et al., 2014).

De maneira interessante, todas as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo observadas nos animais DBT, foram revertidas pelo

tratamento repetido com a BIX, promovendo efeitos comparáveis à INS. Suportando nossos dados, estudos *in vitro* já demonstraram a habilidade da BIX em eliminar ROS e RNS (TAY-AGBOZO et al., 2018). Além disso, utilizando modelos *in vivo*, estudos prévios demonstraram que ratos com DM1 tratados durante 30 e 50 dias com esse carotenoide, apresentaram diminuição de LPO e aumento de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (glutathiona peroxidase), além de GSH, no plasma e fígado desses animais (ASSIS et al., 2017; PEREIRA, 2013; ROEHRS et al., 2014). Dessa forma, é plausível hipotetizar que o efeito antinociceptivo, do tipo-antidepressivo e ansiolítico do tratamento repetido com BIX, possa estar associado ao reestabelecimento de parâmetros do EO em tecidos relacionados a essas comorbidades diabéticas.

É importante enfatizar que associado ao estresse oxidativo, a inflamação crônica também pode exercer um papel fundamental na patogênese das complicações e comorbidades diabéticas. Está amplamente aceito na literatura que a hiperglicemia a longo prazo está associada a eventos inflamatórios, especialmente em tecidos microvasculares e neuronais. Além disso, diversos autores demonstram a regulação positiva do fator nuclear NF- κ B em diferentes neurônios de ratos diabéticos, e que sua inibição pode aliviar significativamente a resposta nociceptiva, do tipo-ansiosa e depressiva desses animais (BADESCU et al., 2016; KIASALARI; RAHMANI; MAHMOUDI, N., 2017; ZHOU, J; ZHANGAAND, Z; QIAN, 2018). Dessa forma, as propriedades anti-inflamatórias da BIX, inclusive sobre o NF- κ B (GOTO et al., 2012; PACHECO et al., 2019; TAKAHASHI; GOTO; TAIMATSU; EGAWA; KATOH; KUSUDO; SAKAMOTO; OHYANE; LEE, J. Y.; et al., 2009; XU, Z.; KONG, X. Q., 2017), e da INS podem, pelo menos em parte, contribuir para os efeitos positivos dessas observados no presente estudo.

Como nenhum dos tratamentos utilizados no presente estudo foi capaz de induzir uma reversão completa da hiperalgesia mecânica, atividade locomotora, comportamento do tipo-depressivo e ansioso, o estresse oxidativo e a inflamação não parecem ser os únicos fatores envolvidos na fisiopatologia dessas comorbidades e complicações ao diabetes. Estudos futuros são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessas

doenças, e dos mecanismos envolvidos aos efeitos da BIX sobre esse modelo animal.

A partir dos resultados obtidos, futuramente pretende-se explorar a associação de doses inefetivas de INS e BIX em modelos de diabetes do tipo 1. Além disso, pretende-se avaliar o efeito da BIX, isoladamente e em associação à drogas hipoglicemiantes, em modelos de diabetes do tipo 2, objetivando avaliar a potencial melhora da sensibilidade à insulina nesses animais. Acredita-se que com esses testes, uma visão mais completa dos efeitos da BIX sobre modelos animais de diabetes, seria encontrada.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos dados demonstraram pela primeira vez na literatura a capacidade da BIX em exercer efeito agudo e cumulativo em modelo de dor neuropática induzida pelo diabetes, em ratos. Além disso, o tratamento cumulativo exerceu efeitos significativos sobre o comportamento tipo-ansioso e depressivo desses animais. Esses efeitos não parecem estar associados a déficit locomotor. Em contraste, os resultados desse estudo demonstraram especificamente a melhora do percentual de HbA1 e de parâmetros indiretos do estresse oxidativo no CPF, HIP, ME e NC, tecidos amplamente relacionados com essas comorbidades e complicações diabéticas. Considerando a dificuldade de se obter um controle glicêmico estrito em pacientes com DM1 que diariamente utilizam INS, associado ao desafio de tratar as psicopatologias associadas ao diabetes, nossos dados suportam a hipótese de que a BIX pode representar uma alternativa terapêutica para tratar as principais complicações e comorbidades associadas ao diabetes, potencialmente possibilitando a diminuição da polimedicação nesses pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C. A. *et al.* Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. **Diabetes Care**, 2011. v. 34, n. 10, p. 2220–2224.
- ABDEL-KADER, M. S. *et al.* Effect of Olive leaves extract on the antidiabetic effect of glyburide for possible herb-drug interaction. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.10.001>>.
- ADILI, F.; LARIJANI, B.; HAGHIGHATPANAH, M. Diabetic patients: Psychological aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2006. v. 1084, p. 329–349.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, 1984. v. 105, n. 13, p. 121–126.
- AHMAD, K. Insulin sources and types : a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2014. v. 34, n. 2, p. 234–237. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272\(14\)60084-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272(14)60084-4)>.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Rapid Onset Pain Induced by Intravenous Streptozotocin in the Rat. **The Journal of Pain**, 2001. v. 2, n. 3, p. 146–150.
- ASSIS, R. P. *et al.* Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017. v. 18, n. 332, p. 1–20.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, 2014. v. 383, n. 9911, p. 69–82. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)>.
- BABAEV, O.; PILETTI CHATAIN, C.; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental and Molecular Medicine**, 2018. v. 50, n. 4, p. 1–16. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0063-8>>.
- BADESCU, S. V. *et al.* The association between Diabetes mellitus and Depression. **Journal of medicine and life**, 2016. v. 9, n. 2, p. 120–125.
- BAIR, M. J. *et al.* Prevalence of pain and association with quality of life, depression and glycaemic control in patients with diabetes. **Diabetic Medicine**,

2010. v. 27, n. 5, p. 578–584.

BARAT, P. *et al.* The growing incidence of type 1 diabetes in children: The 17-year French experience in Aquitaine. **Diabetes and Metabolism**, 2008. v. 34, n. 6, p. 601–605.

BARRETT, A. M. *et al.* Epidemiology, public health burden, and treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: A review. **Pain Medicine**, 2007. v. 8, n. SUPPL. 2, p. 50–62.

BASBAUM, A. I. *et al.* Review Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, 2009. v. 139, p. 267–284.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. **Diabetes**, 1999. v. 48, n. 1, p. 1–10.

BERTELSMANN, F. W. *et al.* Peripheral nerve function in patients with painful diabetic neuropathy treated with continuous subcutaneous insulin infusion. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, 1987. v. 50, n. 10, p. 1337–1341.

BETTERIDGE, J. D. What Is Oxidative Stress? **Metabolism**, 2000. v. 49, n. 2, p. 3–8.

BICKETT, A.; TAPP, H. Anxiety and diabetes: Innovative approaches to management in primary care. **Experimental Biology and Medicine**, 2016. v. 241, n. 15, p. 1724–1731.

BOULANGER, L. *et al.* A retrospective study on the impact of comorbid depression or anxiety on healthcare resource use and costs among diabetic neuropathy patients. **BMC Health Services Research**, 2009. v. 11, p. 1–11.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. **Neurosurgery Clin**, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976. v. 72, n. 1–2, p. 248–254.

BRAGA, J. E. F. *et al.* Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 2010. v. 14, n. 2, p. 93–100.

BRUEHLA, H.; WOLF, O. T.; CONVIT, A. A blunted cortisol awakening response and hippocampal atrophy in type 2 diabetes mellitus. **Psychoneuroendocrinology**, 2014. v. 27, n. 4, p. 1–19.

- BRUSSEE, V.; CUNNINGHAM, F. A.; ZOCHODNE, D. W. Direct Insulin Signaling of Neurons Reverses Diabetic. **Diabetes**, 2004. v. 53, n. 1824–1830.
- BUCHBERGER, B. *et al.* Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, 2016. v. 70, p. 70–84. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.019>>.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; MEDICINE, F. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 2011. v. 25, n. 3, p. 287–299. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>>.
- BYSTRITSKY, A.; DANIAL, J.; KRONEMYER, D. Interactions Between Diabetes and Anxiety and Depression Implications for Treatment. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, 2014. v. 43, p. 269–283.
- CALCUTT, N. A. *et al.* Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. **Pain**, 1996. v. 68, n. 2–3, p. 293–299.
- CAREK, P. J.; LAIBSTAIN, S. E.; CAREK, S. M. Exercise for the treatment of depression and anxiety. **International Journal of Psychiatry in Medicine**, 2011. v. 41, n. 1, p. 15–28.
- CARILLON, J. *et al.* Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. **Pharmaceutical Research**, 2013. v. 30, n. 11, p. 2718–2728.
- COBLEY, J. N.; FIORELLO, M. L.; BAILEY, D. M. Redox Biology 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, 2018. v. 15, n. January, p. 490–503. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>>.
- COHEN, L. B. *et al.* Pharmacist-led telehealth disease management for patients with diabetes and depression. **Journal of Telemedicine and Telecare**, 2019. v. 0, n. 0, p. 1–9.
- COSTA, A. A. *et al.* A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience Methods**, 2014. v. 236, p. 1–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.006>>.

COURTEIX, C. *et al.* Daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats. **NeuroReport**, 1996. v. 7, p. 1922–1924.

CUNHA, Joice M. *et al.* Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2008. v. 57, n. 7, p. 873–881.

D'AMATO, C. *et al.* Diabetic peripheral neuropathic pain is a stronger predictor of depression than other diabetic complications and comorbidities. **Diabetes and Vascular Disease Research**, 2016. v. 13, n. 6, p. 418–428.

DEROSA, G. *et al.* GLYCO-METABOLIC CONTROL, INFLAMMATION MARKERS AND CARDIOVASCULAR OUTCOMES IN TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETIC PATIENTS ON INSULIN PUMP OR MULTIPLE DAILY INJECTION (ITALICO study). **Diabetes/Metabolism Research and Reviews.**, 2019. p. 1–19. Disponível em: <10.1002/dmrr.3219>.

DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Diabetes-Related Complications. **Physical Therapy Volume**, 2008. v. 88, n. 11, p. 1254–1264.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of Pain. **Seminars in Pediatric Neurology**, 2016. v. 23, n. 3, p. 201–208. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2016.10.003>>.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, 1997. v. 54, p. 597–606.

DZIEMIDOK, P. Relationship between diabetic neuropathy and occurrence of depression among diabetic patients. **Psychiatria Polska**, 2015. v. 2674, n. 19.

ERGENC, M. *et al.* Melatonin reverses depressive and anxiety like- behaviours induced by diabetes: involvement of oxidative stress, age, rage and S100B levels in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 2019. v. 0, n. 0, p. 1–9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1684954>>.

FELDMAN, E. L. *et al.* New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. **Neuron**, 2017. v. 93, n. 6, p. 1296–1313. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>>.

FLECK, M.; BERLIM, M.; LAFER, B. Revisão das diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. **Rev Bras ...**, 2009. v. 31, n.

Supl I, p. 7–17. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbp/v31s1/a03v31s1.pdf>>.

FONTELLA, F. U. *et al.* Repeated Restraint Stress Induces Oxidative Damage in Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, 2005. v. 30, n. 1, p. 105–111.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**, 2013. v. 93, p. 137–188.

FREELAND, B. Insulin for the treatment of Diabetes Mellitus. **Home Healthcare Now**, 2016. v. 34, n. 8, p. 416–423.

GAMBETA, E.; SOUZA, Camila Pasquini De; MORAIS, H. De. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. **Metabolic Brain Disease**, 2015.

GAO, R. *et al.* Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 1998. v. 45, n. 1, p. 41–45.

GARTLEHNER, G. *et al.* Pharmacological and non- pharmacological treatments for major depressive disorder : review of systematic reviews. **BMJ Open**, 2017. v. 7, p. 1–14.

GEELLEN, C. C. *et al.* Anxiety affects disability and quality of life in patients with painful diabetic neuropathy. **European Journal of Pain**, 2017. v. 21, n. 10, p. 1–10.

GELFUSO, É. A. *et al.* Anxiety: A Systematic Review of Neurobiology, Traditional Pharmaceuticals and Novel Alternatives from Medicinal Plants. **CNS & CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, 2014. v. 13, p. 150–165.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, 2010. v. 107, n. 9, p. 1058–1070.

GIBBONS, C. H. Treatment-Induced Neuropathy of Diabetes. **Current Diabetes Reports**, 2017. v. 17, n. 127, p. 1–6.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, 2015. v. 90, n. 4, p. 532–545. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.01.018>>.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, 2017. v. 398, n. 10, p. 1095–1108.

GOLIN, S. D. *et al.* Teor de bixina em duas variedades de Bixa orellana L.

cultivadas no Paraná. **Visão acadêmica**, 2013. v. 14, n. 4, p. 37–48.

GORE, M. *et al.* Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep.

Journal of Pain and Symptom Management, 2005. v. 30, n. 4, p. 374–385.

GOTO, T. *et al.* Bixin Activates PPAR α and Improves Obesity-Induced Abnormalities of Carbohydrate and Lipid Metabolism in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012. v. 60, p. 11952–11958.

GUPTA, D.; KURHE, Y.; RADHAKRISHNAN, M. Physiology & Behavior Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. **Physiology & Behavior**, 2014. v. 129, p. 73–78. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.036>>.

HAIDER, S. *et al.* Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol Belg**, 2013. v. 113, p. 35–41.

HASSLER, S. N.; JOHNSON, K.; HULSEBOSCH, C. Reactive oxygen species and lipid peroxidation inhibitors reduce mechanical sensitivity in a chronic neuropathic pain model of spinal cord injury in rats. **Journal of Neurochemistry**, 2014. v. 131, n. 4, p. 413–417.

HO, N. *et al.* Physiology & Behavior Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. **Physiology & Behavior**, 2012. v. 105, n. 3, p. 702–708. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.003>>.

HOLLEY, A. K. *et al.* Manganese superoxide dismutase: Beyond life and death. **Amino Acids**, 2012. v. 42, n. 1, p. 139–158.

HOLMSTRÖM, M. R.; HÄGGSTRÖM, M.; SÖDERBERG, S. Being Facilitators in a Challenging Context-School Personnel's Experiences of Caring for Youth with Diabetes Type 1. **Journal of Pediatric Nursing**, 2018. v. 43, p. e114–e119. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pedn.2018.08.007>>.

HUANG, C.; LEE, C.; HSU, K. The Role of Insulin Receptor Signaling in Synaptic. **Chang Gung Med J**, 2010. v. 33, n. 2, p. 115–125.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2018. v. 108, n. August, p. 656–662. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>>.

IMPELLIZZERI, D. *et al.* The neuroprotective effects of micronized PEA (PEA-

m) formulation on diabetic peripheral neuropathy in mice. **FASEB Journal**, 2019. n. 3.

JAIN, R. *et al.* Painful diabetic neuropathy is more than pain alone: Examining the role of anxiety and depression as mediators and complicators. **Current Diabetes Reports**, 2011. v. 11, n. 4, p. 275–284.

JENSEN, T. S. *et al.* New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes and Vascular Disease Research**, 2006. v. 3, n. 2, p. 108–119.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the Pathophysiology of Depression: From Monoamines to the Neurogenesis Hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, 2017. v. 341, p. 79–90. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.025>>.

JESUS, C. H. *et al.* Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. **Brain Research**, 2019. v. 1715, n. September 2018, p. 156–164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.014>>.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, 1992. v. 202, n. 2, p. 384–389.

KHALIGHI, Z. *et al.* Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews The prevalence of depression and anxiety in Iranian patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2019. v. 13, n. 4, p. 2785–2794. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.07.004>>.

KIASALARI, Z.; RAHMANI, T.; MAHMOUDI, N. ScienceDirect Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, 2017. v. 86, p. 654–661. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.068>>.

KILPATRICK, E. S. Editorials Toward a Global Overview of HbA1c Test Performance. **Clinical Chemistry**, 2018. v. 64, n. 8, p. 1–2.

KLEINRIDDERS, A. *et al.* Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. **Diabetes**, 2014. v. 63, p. 2232–2243.

KRAEUTER, A.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The elevated plus maze test for

measuring anxiety-like behavior in rodents. **Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols**, 2019. v. 1916, p. 69–74.

KULKANTRAKORN, K.; LORSUWANSIRI, C. Sensory profile and its impact on quality of life in patients with painful diabetic polyneuropathy. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, 2013. v. 4, n. 3, p. 267–270.

KWON, M. *et al.* The Role of Descending Inhibitory Pathways on Chronic Pain Modulation and Clinical Implications. **World Institute of Pain**, 2013. v. 14, n. 7, p. 656–667.

LAKEY-BEITIA, J.; D, J. K.; HEGDE, M. L. Carotenoids as Novel Therapeutic Molecules Against Neurodegenerative Disorders: Chemistry and Molecular Docking Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019. v. 20, p. 1–22.

LANG, U. E.; BORGWARDT, S. Molecular mechanisms of depression: Perspectives on new treatment strategies. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2013. v. 31, n. 6, p. 761–777.

LAPA BAUTISTA, A. R. P. . G *et al.* Oral toxicity assessment of annatto in rats [Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos]. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2004. v. 40, n. 2, p. 229–233.

LEE, S. *et al.* Depression research: where are we now? **Molecular Brain**, 2010. v. 3, n. 8, p. 1–10.

LEVY, L. W. *et al.* Bixin and norbixin in human plasma: Determination and study of the absorption of a single-dose of annatto food color. **Analyst**, 1997. v. 122, n. 9, p. 977–980.

LOCHMANN, D.; RICHARDSON, T. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 2018. v. 164, n. 2004, p. 1–10.

LUSTMAN, P. J. *et al.* Effects of nortriptyline on depression and glycemic control in diabetes: Results of a double-blind, placebo-controlled trial. **Psychosomatic Medicine**, 1997. v. 59, n. 3, p. 241–250.

MAAHS, D. M. *et al.* Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, 2010. v. 39, n. 3, p. 481–497.

MACQUEEN, G. *et al.* Systematic Review of Clinical Practice Guidelines for Failed Antidepressant Treatment Response in Major Depressive Disorder, Dysthymia, and Subthreshold Depression in Adults. **Canadian Journal of**

Psychiatry, 2017. v. 62, n. 1, p. 11–23.

MAES, M. *et al.* A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2011. v. 35, n. 3, p. 676–692. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.004>>.

MAGALHÃES, G. L. *et al.* Atualização dos critérios diagnósticos para Diabetes Mellitus utilizando a A1C. **HU Revista**, 2012. v. 37, n. 3, p. 361–367.

MALYKHIN, N. V.; COUPLAND, N. J. Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. **Neuroscience**, 2015. v. 309, p. 200–213. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.047>>.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; III, J. B. W. Diabetes , Oxidative Stress , and Antioxidants : A Review. **J Biochemical Molecular Toxicology**, 2003. v. 17, n. 1, p. 24–38.

MATEJKO, B. *et al.* Type 1 Diabetes and Combat Sports: Improvement in Glycemic Control With Gained Experience. **Journal of Diabetes Science and Technology**, 2018. v. 12, n. 5, p. 1088–1089.

MATUO, M. C. S. *et al.* Effect of bixin and norbixin on the expression of cytochrome p450 in hepg2 cell line. **Cell Biology International**, 2013. v. 37, n. 8, p. 843–848.

MCINTYRE, R. S. *et al.* The effect of antidepressants on glucose homeostasis and insulin sensitivity: Synthesis and mechanisms. **Expert Opinion on Drug Safety**, 2006. v. 5, n. 1, p. 157–168.

MELKERSSON, K. I.; DAHL, M. L. Relationship between levels of insulin or triglycerides and serum concentrations of the atypical antipsychotics clozapine and olanzapine in patients on treatment with therapeutic doses. **Psychopharmacology**, 2003. v. 170, n. 2, p. 157–166.

MENEZES ZANOVELI, J. *et al.* Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. **Current Diabetes Reviews**, 2016. v. 12, n. 3, p. 165–178.

MEZUK, B. *et al.* Depression and type 2 diabetes over the lifespan: A meta-analysis. **Diabetes Care**, 2008. v. 31, n. 12, p. 2383–2390.

MORAIS, H. DE *et al.* Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic

rats. **Behavioural Brain Research**, 2014. v. 258, p. 52–64. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.011>>.

MORALES-VIDAL, S. *et al.* Diabetic peripheral neuropathy and the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Postgraduate Medicine**, 2012. v. 124, n. 4, p. 145–153.

MUSCOLI, C. *et al.* On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. **British Journal of Pharmacology**, 2003. v. 140, n. 3, p. 445–460.

NAICKER, K. *et al.* Symptoms of anxiety and depression in type 2 diabetes: Associations with clinical diabetes measures and self-management outcomes in the Norwegian HUNT study. **Psychoneuroendocrinology**, 2017. v. 84, p. 116–123. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.07.002>>.

NARANJO, C. *et al.* Expert Review of Neurotherapeutics Anxiety , depression and sleep disorders in patients with diabetic neuropathic pain : a systematic review. **Expert Review of Neurotherapeutics**, 2019. v. 0, n. 0, p. 1–9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1653760>>.

NATHAN, D. M. *et al.* Translating the A1C Assay Into Estimated. **Diabetes Care**, 2008. v. 31, n. 8, p. 1473–1478.

OBROSOVA, I. G. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? **International Review of Neurobiology**, 2002. v. 50, p. 3–35.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G. DE *et al.* Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. v. 125, n. February, p. 549–561. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>>.

OPIO, J. N.; TUFANARU, C.; AROMATARIS, E. Prevalence of mental disorders in Uganda: a systematic. **JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports**, 2018. v. 16, n. 8, p. 1613–1620.

OZAKI, K. *et al.* Insulin-Ameliorated Peripheral Motor Neuropathy in Spontaneously Diabetic WBN / Kob Rats. **J Vet. Med. Sci**, 2013. v. 75, n. 10, p. 1323–1328.

PACHECO, S. D. G. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Bixin, a Carotenoid Extracted from the Seeds of *Bixa orellana*. **Planta Medica**, 2019.

PAPATHEODOROU, K. *et al.* Complications of Diabetes 2017. **Journal of Diabetes Research**, 2018. v. 2018.

PARK, J. S. *et al.* Bixin uptake and antioxidative effect and role in immunoregulation in domestic cats 1. **Journal of Animal Science.**, 2016. v. 94, p. 125–134.

_____; MATHISON, B. D.; CHEW, B. P. Uptake and immunomodulatory role of bixin in dogs 1. 2018. n. July, p. 135–143.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 1985. v. 14, n. 3, p. 149–167.

PENNATHUR, S.; HEINECKE, J. W. MECHANISMS OF OXIDATIVE STRESS IN DIABETES: IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF VASCULAR DISEASE AND ANTIOXIDANT THERAPY. **Frontiers in Bioscience**, 2004. v. 9, p. 565–574.

PEREIRA, M. M. *et al.* The antioxidant gallic acid induces anxiolytic- , but not antidepressant-like effect , in streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, 2018.

PEREIRA, R. De C. **ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA E PROTETORA DA BIXINA NO FÍGADO DE RATOS TRATADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA.** [S.I.]: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2013.

PICONI, L.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A. Oxidative Stress in Diabetes. **Clin Chem Lab Med**, 2003. v. 41, n. 9, p. 1144–1149.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. *et al.* Evidence of hypoglycemic, lipid-lowering and hepatoprotective effects of the Bixin and Bixin: β -CD inclusion compound in high-fat-fed obese mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018. v. 106, n. June, p. 363–372. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.144>>.

PORSOLT, R. D. *et al.* Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, 1978. v. 47, n. 4, p. 379–391.

RACHANA, K. S.; MANU, M. S.; ADVIRAO, G. M. Insulin influenced expression of myelin proteins in diabetic peripheral neuropathy. **Neuroscience Letters**, 2016. v. 629, p. 110–130. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.067>>.

Rachana, K. S.; MANU, M. S.; ADVIRAO, G. M. Insulin-induced upregulation of lipoprotein lipase in Schwann cells during diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2018. v. 37, p. 1–6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.017>>.

RADNOVICH, R. *et al.* Acute Pain: Effective Management Requires Comprehensive Assessment. **Postgraduate Medicine**, 2014. v. 126, n. 4, p. 59–72.

RAJCHGOT, T. *et al.* Neurons and Microglia; A Sickly-Sweet Duo in Diabetic Pain Neuropathy. **Frontiers in Neuroscience**, 2019. v. 13, n. January, p. 1–17.

READ, J. *et al.* The interpersonal adverse effects reported by 1008 users of antidepressants; and the incremental impact of polypharmacy. **Psychiatry Research**, 2017. v. 256, p. 423–427. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2017.07.003>>.

REBAI, R.; JASMIN, L.; BOUDAH, A. The antidepressant effect of melatonin and fluoxetine in diabetic rats is associated with a reduction of the oxidative stress in the prefrontal and hippocampal cortices. **Brain Research Bulletin**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.013>>.

REDDY, M. K.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; NAIR, M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005. v. 53, n. 23, p. 9268–9273.

REDIVO, D. D.B. *et al.* Acute antinociceptive effect of fish oil or its major compounds, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on diabetic neuropathic pain depends on opioid system activation. **Behavioural Brain Research**, 2019. v. 372, n. May, p. 111992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111992>>.

REDIVO, Daiany D.B. *et al.* Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, 2016. v. 298, p. 57–64. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.058>>.

REHBEIN, J. *et al.* Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. **Journal of Separation Science**, 2007. v. 30, n. 15, p. 2382–2390.

RÉUS, G. Z. *et al.* Pathophysiological mechanisms involved in the relationship

between diabetes and major depressive disorder. **Life Sciences**, 2017. v. 183, p. 78–82. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.06.025>>.

ROCHA, A. P. C. *et al.* Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Rev Bras Anesthesiol**, 2007. v. 57, n. 1, p. 94–105.

ROEHRS, M. *et al.* Bixin and Norbixin Have Opposite Effects on Glycemia , Lipidemia , and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Endocrinology**, 2014. v. 2014, p. 1–10.

_____ *et al.* Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.005>>.

RØNNINGEN, K. S.; NORRIS, J. M.; KNIP, M. Environmental Trigger (s) of Type 1 Diabetes: Why Is It So Difficult to Identify? **BioMed Research International**, 2014. v. 2015, p. 1–2.

RUBIN, R. R. *et al.* Elevated depression symptoms, antidepressant medicine use, and risk of developing diabetes during the diabetes prevention program. **Diabetes Care**, 2008. v. 31, n. 3, p. 420–426.

SACKS, D. B. Hemoglobin Variants and Hemoglobin A 1c Analysis : Problem Solved ? **Clinical Chemistry**, 2003. v. 49, n. 8, p. 1245–1247.

SANTIAGO, R. M. *et al.* Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2010. v. 34, n. 6, p. 1104–1114. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.004>>.

SANTOS, G. *et al.* Effect of bixin on DNA damage and cell death induced by doxorubicin in HL60 cell line. **Human & Experimental Toxicology**, 2016. v. 35, n. 12, p. 1319–1327.

SANTOS, G. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M L P. Effect of bixin on DNA damage and cell death induced by doxorubicin in HL60 cell line. 2016.

SAUDEK, C. D.; BRICK, J. C. The Clinical Use of Hemoglobin A1c. **Journal of diabetes Science and Technology**, 2009. v. 3, n. 4, p. 629–634.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**, 2004. v. 389, p. 237–243.

SCHIELE, M. A.; DOMSCHKE, K. Epigenetics at the crossroads between

genes, environment and resilience in anxiety disorders. **Genes, Brain and Behavior**, 2018. v. 17, n. 3, p. 1–13.

SCHREIBER, A. K. *et al.* Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World Journal of Diabetes**, 2015. v. 6, n. 3, p. 432–444.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 1968. v. 25, n. C, p. 192–205.

SEMENKOVICH, K. *et al.* Depression in type 2 diabetes mellitus: Prevalence, impact, and treatment. **Drugs**, 2015. v. 75, n. 6, p. 577–587. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40265-015-0347-4>>.

SESTILE, C. C. *et al.* Antidepressant-like Effect of Insulin in Streptozotocin-induced Type 2 Diabetes Mellitus Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2016. v. 119, n. 3, p. 243–248.

SIES, H. Glutathione, Reduced (GSH). **Alternative Medicine Review**, 2001. v. 6, n. 6, p. 601–607.

SIES, H. Redox Biology Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, 2015. v. 4, p. 180–183. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>>.

SILVA, C. R.; GREGGI ANTUNES, L. M.; BIANCHI, Maria Lourdes P. DE. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, 2001. v. 43, n. 6, p. 561–566.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, 2001. v. 50, p. 536–546.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KATOH, S.; KUSUDO, T.; SAKAMOTO, T.; OHYANE, C.; LEE, J.; *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR α activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2009. v. 390, n. 4, p. 1372–1376. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.162>>.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KATOH, S.; KUSUDO, T.; SAKAMOTO, T.; OHYANE, C.; LEE, J. Y.; KIM, Y. I.; UEMURA, T.; AKU H.; SHIZUKA K. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and

enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2009. v. 390, n. 4, p. 1372–1376.

TAO, S. *et al.* Bixin protects mice against ventilation-induced lung injury in an NRF2-dependent manner. **Nature Publishing Group**, 2016. p. 1–13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep18760>>.

TAY-AGBOZO, S.; STREET, S.; KISPERT, L. The carotenoid Bixin found to exhibit the highest measured carotenoid oxidation potential to date consistent with its practical protective use in cosmetics, drugs and food. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2018. v. 186, n. June, p. 1–8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.016>>.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J. M.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care**, 2013. v. 36, n. 9, p. 2456–2465.

THEVIS, M.; THOMAS, A.; SCHA, W. Insulin. **Doping in Sports**, 2010. v. 195, p. 209–226.

THIBAUT, F. Anxiety disorders: a review of current literature. **Dialogues Clin Neurosci**, 2017. v. 19, n. 2, p. 87–88.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, 2004. v. 46, n. 3, p. 295–309.

VILAR, D. De A. *et al.* Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, 2014. v. 2014, p. 1–11.

VINCENT, A. M. *et al.* Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. **Endocrine Reviews**, 2004. v. 25, n. 4, p. 612–628.

WALDFOGEL, J. M. *et al.* Pharmacotherapy for diabetic peripheral neuropathy pain and quality of life A systematic review. **Neurology**, 2017. v. 88, p. 1–10.

WALVISCH, J. International Journal of Law and Psychiatry De fi ning “ mental disorder ” in legal contexts. **International Journal of Law and Psychiatry**, 2017. v. 52, p. 7–18.

WANG, X. *et al.* Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2010. v. 2, n. March, p. 1–13.

WAYHS, C. A. Y. *et al.* Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-

induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. **Metabolic Brain Disease**, 2010. v. 25, p. 297–304.

WEI, W. *et al.* OXIDATIVE STRESS, DIABETES, AND DIABETIC COMPLICATIONS. **Hemoglobin**, 2009. v. 33, n. 5, p. 370–377.

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, 2008. v. 5, n. 47, p. 1–14.

XU, Z.; KONG, X. ScienceDirect Bixin ameliorates high fat diet-induced cardiac injury in mice through inflammation and oxidative stress suppression. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, 2017. v. 89, p. 991–1004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.052>>.

KONG, X. Q. Bixin ameliorates high fat diet-induced cardiac injury in mice through inflammation and oxidative stress suppression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017. v. 89, p. 991–1004.

YAMAMOTO, H. *et al.* Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, 2009. v. 57, n. 4, p. 403–408. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.037>>.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, 2015. v. 97, p. 1–7.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chemical Reviews**, 2011. v. 111, p. 5944–5972.

ZHANG, H. *et al.* Therapeutic potential of bixin in PM2.5 particles-induced lung injury in an Nrf2-dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018. v. 126, n. August, p. 166–176. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.015>>.

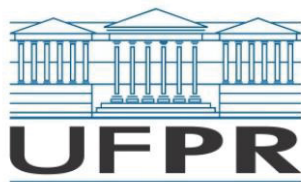
ZHOU, J; ZHANGAAND, Z; QIAN, G. Neuropathy and inflammation in diabetic bone marrow. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 2018. v. DOI:10.100.

ZIEGLER, D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 2008. v. 24, n. 1, p. 52–57.

Anexo 1 – CEUA/BIO Nº 1294

SEI/UFPR - 2115063 - CEUA/BIO: Certificado

05/01/2021 11:21



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1294

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.037823/2019-31

APROVADO/APPROVAL: 18/06/2019 – R.O. 05/2019

TÍTULO: Efeito do tratamento com bixina sobre a dor neuropática, depressão e ansiedade associadas ao diabetes experimental induzido por estreptozotocina.

TITLE: Effect of treatment with bixin on neuropathic pain, depression and anxiety associated with experimental diabetes induced by streptozotocin.

AUTORES/AUTHORS: Joice Maria da Cunha, Alexia Thamara Gasparin, Carlos Henrique Alves de Jesus, Evelize Stacoviaki Rosa.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 10/09/2019, às 15:35, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAICO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/09/2020, às 18:46, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2115063** e o código CRC **FF179451**.

Criado por **iselen**, versão 2 por **iselen** em 10/09/2019 15:32:35.